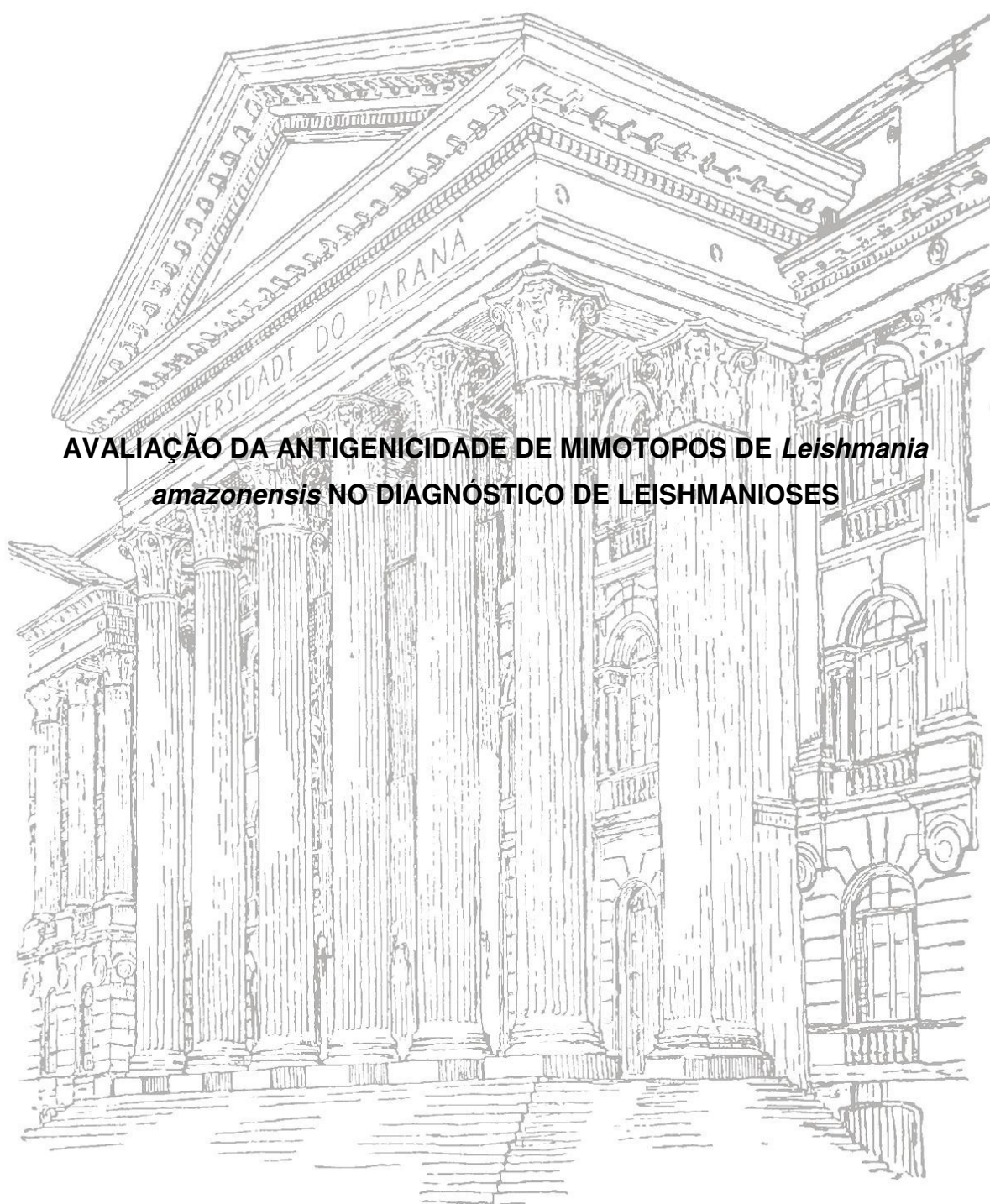


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOIZE BOMBARDELLI GOMES



AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE MIMOTOPOS DE *Leishmania amazonensis* NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES

CURITIBA

2016

LOIZE BOMBARDELLI GOMES

**AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE MIMOTOPOS DE *Leishmania*
amazonensis NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Vanete Thomaz Soccol
Co-Orientadora: Dra. Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Gomes, Loize Bombardelli

Avaliação da antigenicidade de mimotopos de *Leishmania amazonensis* no diagnóstico de leishmanioses. / Loize Bombardelli Gomes. – Curitiba, 2016.

56 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora: Juliana Ferreira de Moura

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Leishmaniose 2. Imunodiagnóstico 3. Peptídeos I. Título II. Soccol, Vanete Thomaz III. Moura, Juliana Ferreira de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 614.534
616.9364



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

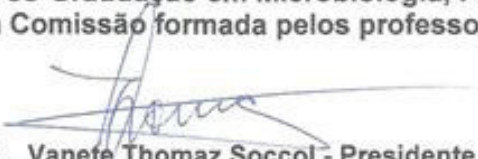
TERMO DE APROVAÇÃO

**“Avaliação da antigenicidade de mimotopos de
Leishmania amazonensi no diagnóstico de
leishmanioses”**


por

Loize Bombardelli Gomes

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol - Presidente


Profa. Dra. Juliana F. de Moura


Profa. Dra. Ligia Barizon


Prof. Dr. Cláudio Piechnik

Curitiba, 13 de dezembro de 2016.

Aos meus pais, Rosimery e Luiz Carlos.
Ao meu irmão, Lucas.
Por todo amor, apoio, ajuda, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A toda a minha família, pelo apoio, incentivo, carinho e amor a mim ofertados, nos bons e maus momentos.

À professora Dra. Vanete Thomaz Soccol pela orientação, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos, atenção, disponibilidade e incentivo durante todo o período do mestrado.

À professora Dra. Juliana Ferreira de Moura, pela co-orientação, por colocar à disposição os equipamentos e materiais do Laboratório de Imunoquímica, pela paciência e contribuições, certamente importantes para a finalização deste trabalho.

À professora Dra. Rosângela Clara Paulino, pela atenção, pelos ensinamentos e contribuição prestada.

Ao professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, pela ajuda, atenção e ensinamentos prestados na época em que estive no Laboratório de Biologia Molecular do Programa em Processos Biotecnológicos (LBMEBB).

Aos professores do departamento de Patologia Básica: Adriana Frohlich Mercadante, Silvio Marques Zanata, Edilene Alcântara de Castro, Giseli Klassen, Ida Chapaval Pimentel, Vânia Aparecida Vicente, Lia Sumie Nakao e Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro pelas disciplinas ministradas e pelo conhecimento transmitido.

Aos colegas do LBMEBB em geral, pelo apoio, incentivo, pelo conhecimento repassado e ajudas prestadas, para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica, por toda receptividade, atenção, paciência e colaboração, as quais foram muito importantes para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal Do Paraná (UFPR), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, por ter me proporcionado a efetuação deste trabalho, além das condições técnicas para o seu desenvolvimento.

“Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a.”
William Shakespeare

RESUMO

Leishmania Ross, 1903 é um protozoário que causa infecção parasitária denominada leishmaniose. Apresentam-se em duas formas clínicas principais, a Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV). Mais de um milhão de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo, acometendo pessoas de todas as faixas etárias de ambos os sexos. Uma das dificuldades encontradas para o controle dessa doença é a falta de diagnóstico específico, pois não há um que seja considerado padrão ouro. O objetivo deste trabalho foi avaliar doze peptídeos sintéticos, mimotopos de *L. amazonensis*, quanto ao potencial antigênico para fins imunodiagnósticos. Uma infecção experimental de Balb C com *L. amazonensis* foi realizada, seguida da purificação das IgGs dos soros por precipitação, cromatografia e *western blotting*. Após, foi feita a técnica *phage display* e teste *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para seleção dos fagos reagentes. Esses fagos foram amplificados e, os peptídeos pertencentes a esses fagos, sequenciados e analisados *in silico*. Doze peptídeos foram selecionados, sintetizados quimicamente por Fmoc e usados na substituição aos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os peptídeos foram testados frente aos *pools* de soros humano positivo e negativo para LC e frente aos *pools* de soros canino positivo e negativo para LV pelo teste ELISA. Diferentes concentrações dos peptídeos e diluições dos soros foram testadas e são discutidas no presente trabalho. Com base na análise feita por meio das absorbâncias, de doze peptídeos, dois apresentaram significativa diferenciação na reatividade entre *pool* positivo (soros de humanos com LC) e negativo (soros de humanos). Esses doze peptídeos foram testados também frente aos soros de cães com LV e, dois apresentaram significativa diferenciação na reatividade entre *pool* positivo e *pool* negativo. Esse estudo indicou que, os peptídeos poderiam representar vantagens por serem antígenos sintéticos com reprodutibilidade na sua produção, podendo ser usados para imunodiagnóstico de LC ou LV.

Palavras-chave: *Phage Display*. ELISA. Peptídeo sintético. Imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Leishmania Ross, 1903 is a protozoa that causes parasitic infection called leishmaniasis. They present themselves in two main clinical forms, Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Visceral Leishmaniasis (VL). More than one million new cases occur annually worldwide, affecting people of all the age bands of both sexes. One of the difficulties encountered for controlling this disease is the lack of specific diagnosis, because there is no one that is regarded as gold standard. The objective of this work was to evaluate twelve synthetic peptides, mimotopos of *L. amazonensis*, for the antigenic potential for purposes immunodiagnostic tests. An experimental infection of Balb C with *L. amazonensis* was performed, followed by the purification of the IgGs of sera by precipitation, chromatography and western blotting. After, it was made the technique phage display and test Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for selecting the phage reagents. These phage they were amplified and, the peptides belonging to these phage, sequenced and analyzed in silico. Twelve peptides were selected, chemically synthesized by Fmoc and used in substitution to the total antigens of *L. braziliensis* and *L. infantum*. The peptides have been tested against the pools of positive human serum and negative for CL and front of the positive and negative canine serum pools for VL by ELISA test. Different concentrations of serum peptides and dilutions have been tested and are discussed ain this work. Based on the analysis made through the absorbances, of twelve peptides, two presented significant differentiation in the reactivity between positive pool (serum of humans with CL) and negative (sera of humans). These twelve peptides were also tested against the sera of dogs with VL and, two presented significant differentiation in the reactivity between positive pool and negative pool. This study indicated that peptides could represent advantages for being synthetic antigens with reproducibility in their production, and can be used for immunodiagnostic of CL or VL.

Keywords: Phage Display. ELISA. Synthetic Peptide. Immunodiagnostic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FORMA AMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA</i>	20
FIGURA 2 - FORMA PROMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA</i>	20
FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DO PARASITO	22
FIGURA 4 - FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA	24
FIGURA 5 - FORMA MUCO-CUTÂNEA.....	24
FIGURA 6 - FORMA CUTÂNEA-DIFUSA	24
FIGURA 7 - PACIENTE COM HEPATOESPLENOMEGALIA.....	26
FIGURA 8 - CÃO SINTOMÁTICO COM CERATOCONJUNTIVITE.....	26
FIGURA 9 - CÃO SINTOMÁTICO COM ONICOGRIFOSE.....	27
FIGURA 10 - PRINCIPAIS ETAPAS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS REALIZADO NO LBMEBB	43
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DE UMA MICROPLACA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS QUANTO À SUA CONCENTRAÇÃO IDEAL, DILUIÇÕES DOS SOROS POSITIVO E NEGATIVO E CONJUGADO	44
FIGURA 12 - RESPOSTA DO ANTÍGENO TOTAL DE <i>L. braziliensis</i> FRENTE AOS SOROS DE HUMANOS COM LC	46
FIGURA 13 - RESPOSTA DO ANTÍGENO TOTAL DE <i>L. infantum</i> FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV	47
FIGURA 14 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 1 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC	52
FIGURA 15 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 2 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC	52
FIGURA 16 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 4 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC	53
FIGURA 17 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 11 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC	54
FIGURA 18 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 2 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV.....	55
FIGURA 19 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 5 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV.....	56
FIGURA 20 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 7 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV	56

FIGURA 21 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 9 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV.....	57
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE CÃES PARA PRÉ-SELEÇÃO DOS SOROS	41
TABELA 2 - SELEÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES POSITIVOS PARA LC	48
TABELA 3 - ABSORBÂNCIAS DOS SOROS DE CÃES COM LV DO SEGUNDO TESTE ELISA.....	49
TABELA 4 - PROTEÍNAS RELACIONADAS ÀS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i>	50
TABELA 5 - RESULTADO DO “ELISA SCORE” PARA OS PEPTÍDEOS TESTADOS FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC	54
TABELA 6 - RESULTADO DO “ELISA SCORE” PARA OS PEPTÍDEOS TESTADOS FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária
BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*
CAPES – Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior
CNPq – Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico E Tecnológico
CRA – Antígeno Repetitivo Citoplasmático
DIVA – Diferenciação De Animais Infectados Dos Vacinados
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FRA – Antígeno Repetitivo Flagelar
IDRM – Intradermoreação De Montenegro
IEDB – *Immune Epitope Database and Analysis Resource*
IgA – Imunoglobulina A
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
LBMEBB – Laboratório De Biologia Molecular Do Programa Em Processos Biotecnológicos
LC – Leishmaniose Cutânea
LV – Leishmaniose Visceral
MAPIA – Imunoensaio De Impressão Multiantigênica
MS – Ministério Da Saúde
NNN – Meio Bifásico Novy-Mcneal-Nicolle
OMS – Organização Mundial Da Saúde
OPD – Dicloridrato De O-Fenilenodiamina
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCR – Reação Em Cadeia Da Polimerase
RIFI – Reação De Imunofluorescência Indireta
SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear
TR DPP – Teste Rápido Para Leishmaniose Visceral Canina
UFPR – Universidade Federal Do Paraná
y-IFN – Interferon-gama

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Por Cento

°C – Graus Celsius

- – Menos

+ – Mais

® – Marca Registrada

g – Força Centrífuga Relativa

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

pg – Picograma

pH – Potencial Dos Íons Hidrogênio

W – Watt

μm – Micrometro

μg – Micrograma

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 OS PARASITOS.....	20
3.2 OS VETORES	21
3.3 CICLO DE VIDA DO PARASITO.....	21
3.4 AS LEISHMANIOSES	22
3.4.1 Leishmaniose cutânea.....	23
3.4.2 Leishmaniose visceral	25
3.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.....	28
3.6 PEPTÍDEOS.....	30
3.7 <i>PHAGE DISPLAY</i>	33
3.8 ELISA	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	37
4.2.1 Amostras de soro humano	37
4.2.2 Amostras de soro canino.....	37
4.3 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS TOTAIS DE <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	38
4.4 ANTÍGENOS TOTAIS OBTIDOS TESTADOS POR ELISA	39
4.5 SELEÇÃO DE PACIENTES POSITIVOS	40
4.5.1 Pacientes humanos	40
4.5.2 Pacientes caninos	40
4.6 <i>PHAGE DISPLAY</i>	41
4.7 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS PEPTÍDEOS.....	43
4.8 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS.....	43
5 RESULTADOS.....	46
5.1 PADRONIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS TOTAIS	46
5.2 SELEÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES POSITIVOS PARA AS LEISHMANIOSES PELO TESTE ELISA.....	47

5.2.1 Seleção de soros positivos de humanos com leishmaniose cutânea.....	47
5.2.2 Seleção de soros positivos de cães com leishmaniose visceral.....	49
5.3 PEPTÍDEOS SELECIONADOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> SEGUIDO DE ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	50
5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PELO TESTE ELISA	51
5.4.1 Peptídeos avaliados frente aos soros de humanos com leishmaniose cutânea	51
5.4.2 Peptídeos avaliados frente aos soros de cães com leishmaniose visceral	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Leishmania Ross, 1903 é um protozoário que causa infecção parasitária em células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) de mamíferos, incluindo o homem. As doenças causadas por este protozoário são conhecidas como leishmanioses. A transmissão ocorre pela picada de insetos vetores pertencentes à família Psychodidae, sendo que no Velho Mundo o vetor pertence ao gênero *Phlebotomus* enquanto que no Novo Mundo ao gênero *Lutzomyia*. (ROSS, 1903; RANGEL; LAINSON, 2003; REY, 2008; WHO, 2014).

As características clínicas apresentadas são diversas, sendo agrupadas em quatro tipos nosológicos, a leishmaniose cutânea (também conhecida como tegumentar), muco-cutânea, cutânea difusa e visceral (conhecida como kala-azar). (REY, 2008; SANTOS *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Segundo a Organização Mundial Da Saúde (OMS), as leishmanioses ocupam o nono lugar entre as doenças infecciosas individuais, e, ainda são ignoradas nas discussões sobre as prioridades das doenças tropicais. O primeiro relatório técnico, realizado no Comitê de Especialistas em Leishmaniose em março de 2010 pela OMS, aponta a presença da doença nos cinco continentes. (ALVAR *et al.*, 2012).

Aproximadamente 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente. Estima-se que 200.000 a 400.000 desses novos casos pertencem à leishmaniose visceral. Noventa por cento dos casos dessa forma ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão. (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Já a leishmaniose cutânea apresenta em torno de um milhão de casos, ocorrendo principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia. A forma muco-cutânea ocorre principalmente no Brasil, Peru e Bolívia. Apenas cerca de 600.000 casos são realmente relatados, e supõe-se que haja subnotificação da doença. (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2014).

De acordo com Pigott *et al.* (2014), no Novo Mundo, a LC ocorre principalmente na Bacia Amazônica e em outras áreas da floresta tropical. Em contraste, a LV ocorre principalmente ao longo da costa do Brasil, com focos esporádicos no resto da América do Sul e Central. No Velho Mundo, as LC e LV estão presentes desde a Bacia do Mediterrâneo, em todo o Oriente Próximo até o

noroeste da Índia, com alguns focos na China Central, bem como numa fina faixa de risco previsto em toda a África Ocidental e no Corno de África. O Brasil está entre um dos sete países que relatam casos de LC em todo o mundo, com uma média de 28.000 casos por ano.

Desde o primeiro relato da infecção em humanos por *Leishmania*, feita por Ross, até os dias de hoje, foram identificadas de vinte a trinta espécies patogênicas, sendo que dez delas são capazes de infectar humanos. Embora morfologicamente esses parasitos sejam idênticos, podem ser diferenciados por caracteres intrínsecos (análise de isoenzimas ou métodos moleculares). Nos anos 80, Lainson e Shaw dividiram o gênero em dois subgêneros, *Leishmania sensu strictu* e *Viannia*. O subgênero *Viannia* é distribuído estritamente ao Novo Mundo, enquanto que o subgênero *Leishmania* está presente no Novo e Velho Mundo. (LAINSON; SHAW, 1987; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993 a,b).

Os parasitos do subgênero *Viannia* causam lesões na pele do homem, podendo ser únicas ou múltiplas, com caráter extenso e tendência a metastatizar, sem grande quantidade de parasitos nas lesões. Como as lesões ocorrem na pele ou nas mucosas, a doença é denominada de leishmaniose cutânea. Neste subgênero estão incluídos parasitos dos complexos filogenéticos "*Leishmania braziliensis*", constituído por *L. braziliensis* e *L. peruviana*, e "*Leishmania guyanensis*", constituído por *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. shawi*. (LAINSON; SHAW, 1987; MENEZES, 2014; SEGER, 2014; WHO, 2014).

No subgênero *Leishmania*, os parasitos são de crescimento rápido em meios de cultura. No homem, as lesões estão localizadas na pele e geralmente não causam metástases nasofaríngeas. O subgênero é composto pelos complexos "*Leishmania mexicana*", constituído por *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* e *L. garnhami*, e "*Leishmania amazonensis*", constituído por *L. amazonensis*. A LC do Velho Mundo é causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. killicki* e *L. aethiopica*. A forma visceral da doença tem evolução rápida e atinge órgãos como fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos. É constituída pelos complexos "*Leishmania donovani*", composto por *L. donovani*, que causa a LV na Ásia, e "*Leishmania infantum*", constituído por *L. infantum*, que causa LV nas regiões neotropical, mediterrânea e África. (LAINSON; SHAW, 1987; LOPES, 2014; SEGER, 2014; WHO, 2014; PEREIRA, 2015).

A leishmaniose é endêmica na América Latina estando presente em vinte e um países. No Brasil, a leishmaniose ocorre em dezessete, dos vinte e sete estados da federação, estando presente nas duas formas (cutânea e visceral) onde acometem pessoas de todas as faixas etárias, de ambos os sexos. O maior número de casos ocorre na região norte e nordeste do Brasil. Na região sul, o Paraná é o que apresenta maior número de casos. A LC está presente nas regiões do Vale do Rio Ribeira, norte e noroeste e região central, sendo o agente etiológico a *L. braziliensis*. (CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005; SZARGIKI *et al.*, 2009; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011).

A LV é endêmica nos estados do norte e nordeste do Brasil e, mais recentemente, em estados como o Mato Grosso do Sul, Minas Gérias e São Paulo a doença tem se apresentado de forma epidêmica. No estado do Paraná, a LV tem sido demonstrada como alóctone. (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011).

O diagnóstico dessas doenças baseia-se em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. (HIRSCHMANN *et al.*, 2015). Atualmente, os testes laboratoriais usados são: os parasitológicos, os imunológicos, que compreendem testes sorológicos e de imunidade celular (reações intradérmicas) e os moleculares. Por mais que haja eficácia nos testes existentes, não há um que seja utilizado como padrão ouro, além de apresentarem desvantagens como baixa especificidade e sensibilidade (nos imunológicos) ou a possível contaminação das amostras (nos moleculares). (ARAÚJO, 2014; LANA, 2014; SEGER, 2014; PEREIRA, 2015).

A identificação de epítomos e a utilização de peptídeos sintéticos vêm sendo uma alternativa utilizada frente aos antígenos totais. Esses podem servir de ferramenta para detecção de anticorpos específicos contra parasitos e formulação de vacinas. (NOGUEIRA, 2014; PAIVA, 2016).

O *phage display* é uma técnica que utiliza a expressão de peptídeos na superfície de fagos. Assim, é possível realizar a seleção de epítomos com potencial para serem usados como antígenos vacinais, ou no imunodiagnóstico de várias doenças. (SEGER, 2014; SOUZA *et al.*, 2014 a; PAIVA, 2016).

Visando buscar antígenos alternativos e que possam ser reprodutíveis, nosso grupo vem trabalhando com a técnica *phage display* para estudar novos alvos antigênicos, candidatos para o diagnóstico da LC e LV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se os mimotopos de *L. amazonensis*, obtidos por *phage display*, são eficientes na substituição do antígeno total de diferentes espécies de *Leishmania* para a identificação das leishmanioses, usando como base o teste ELISA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar as concentrações dos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum*, as diluições das amostras e os conjugados a serem usadas no teste ELISA.
- Testar os soros de humanos com suspeita clínica de LC frente ao antígeno total de *L. braziliensis*.
- Testar os soros de cães com suspeita clínica de LV frente ao antígeno total de *L. infantum*.
- Selecionar, dentre os soros testados, aqueles com maior título de anticorpos contra *Leishmania* spp.
- Avaliar os peptídeos sintéticos miméticos de antígenos totais de *L. amazonensis*, quanto à capacidade antigênica para o diagnóstico de LC e LV, usando como ferramenta o teste ELISA.

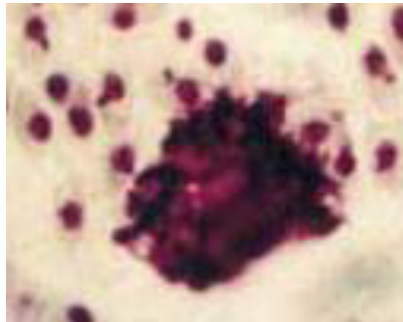
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OS PARASITOS

Os agentes causais das leishmanioses são protozoários da família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Caracterizam-se por apresentarem duas formas durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e a promastigota. As formas amastigotas medem de 2 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura, seu habitat é constituído pelos vacúolos digestivos dos macrófagos que as fagocitam (FIGURA 1). (REY, 2008).

Já as formas promastigotas medem de 14 a 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm de largura, seu habitat é no interior do tubo digestivo de um inseto vetor (flebotomíneo) (FIGURA 2). Devido à multiplicação por divisão binária simples, a taxa de modificações genéticas é baixa, tornando as espécies morfologicamente parecidas, distinguindo-se pelas características clínicas e epidemiológicas que causam. (REY, 2008).

FIGURA 1 - FORMA AMASTIGOTA DE *LEISHMANIA*



FONTE: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2010).

FIGURA 2 - FORMA PROMASTIGOTA DE *LEISHMANIA*



FONTE: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2010).

3.2 OS VETORES

Os flebotomíneos são insetos da família Psychodidae e gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Eles são capazes de transmitir, pela picada, aos vertebrados os parasitos, dando a eles a conferência de hospedeiros invertebrados. (RANGEL; LAINSON, 2003). Se reproduzem em matéria orgânica e têm hábitos crepuscular e noturno. (SANTOS *et al.*, 2014). Somente as fêmeas desenvolvem a hematofagia e, na sua busca pelo alimento, estas podem ingerir e/ou transmitir os protozoários. (RANGEL; LAINSON, 2003).

Distribuem-se amplamente pelos diversos continentes do mundo. No Brasil, a presença destes insetos foi registrada na caatinga, cerrado, florestas úmidas e matas ciliares. (MORAES *et al.*, 2015). As espécies de flebotomíneos comumente envolvidas na transmissão da LC são a *Nyssomyia whitmani*, *N. intermedia*, *N. umbratilis*, *N. flaviscutellata*, *Pintomyia wellcomei*, *P. fischeri*, *P. pessoai*, *P. complexa*, *P. ayrozai* e *P. paraenses*, todas do gênero *Lutzomyia*. Em relação à transmissão da LV, a espécie que mais se destaca é a *Lutzomyia longipalpis*. (LANA, 2014).

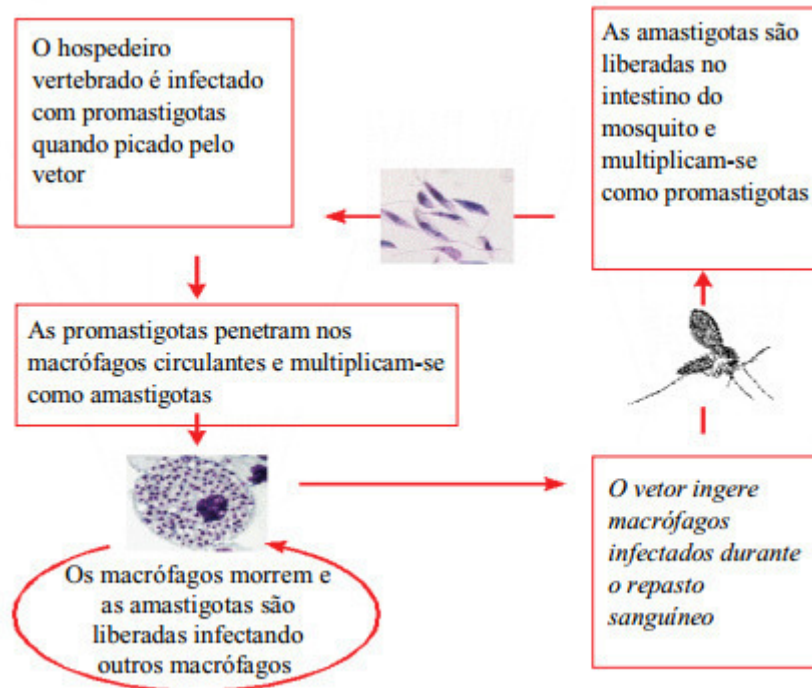
Há uma crescente adaptação de algumas espécies de flebotomíneos a ecótopos artificiais e à condições peridomiciliares. Sugere-se que fragmentos florestais com condições eco-epidemiológicos no centro de grandes cidades poderiam ser potenciais fontes de infecção humana. (FERREIRA *et al.*, 2014).

3.3 CICLO DE VIDA DO PARASITO

O ciclo de vida do parasito inicia-se quando o inseto vetor (flebotomíneo) pica um mamífero parasitado, ingerindo os macrófagos infectados com as formas amastigotas, que acompanham o sangue e/ou linfa intersticial. Ao chegarem ao tubo digestivo do inseto, os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas. Estas formas diferenciam-se em promastigotas não infectantes (forma procíclica) e dão início a uma intensa multiplicação por divisão binária simples. Posteriormente, voltam à probóscide, se diferindo em promastigotas infectantes (formas metacíclicas), até serem liberadas no meio intercelular. (REY, 2008; NOGUEIRA, 2014). Por ocasião de um novo repasto sanguíneo, esses protozoários são inoculados no hospedeiro vertebrado. Lá, são fagocitados pelos macrófagos,

retornando à forma amastigota. Multiplicam-se, também por divisão binária simples, até rompê-los para serem fagocitados por novos macrófagos. Desta forma, há a disseminação para os tecidos ricos em células do SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (FIGURA 3). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DO PARASITO



FONTE: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral (2006).

3.4 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas e estão incluídas entre as endemias mundiais prioritárias, ocupando o nono lugar entre as doenças infecciosas individuais. Há estimativa de 1,3 milhões de novos casos anuais. Isso decorre do seu caráter epidêmico, alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades, comprometendo pele, mucosas e vísceras. (ALVAR *et al.*, 2012; NEGRÃO; FERREIRA, 2014; WHO, 2014). É uma zoonose presente em áreas de baixa renda, evasão populacional, com poucos recursos médicos, dificuldades no diagnóstico e acompanhamento do tratamento. (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Duas são as formas clínicas, a cutânea e a visceral, descritas separadamente por suas diferenças quanto ao aspecto clínico e epidemiológico.

3.4.1 Leishmaniose cutânea

A forma cutânea da doença ocorre em noventa e oito países espalhados nos cinco continentes. Nas Américas, há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. O Brasil é o país de maior prevalência, com registro de casos em todas as regiões. (OLIVEIRA; GILBERT; BÔAS, 2013; WHO, 2014).

A LC tem várias espécies de *Leishmania* como os seus agentes etiológicos, várias ordens de mamíferos como seu reservatório (cães, gatos, roedores, marsupiais e, o homem) e diversas espécies de flebotomíneos como vetores (citados no item 3.2). (MOSCHIN *et al.*, 2013). Entre as espécies envolvidas estão a *Leishmania amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *Viannia braziliensis*, *V. colombiensis*, *V. guyanensis*, *V. lainsoni*, *V. naiffi*, *V. panamensis*, *V. peruviana*, *V. shawi* e *V. lindenbergi*. (PEREIRA, 2015). No Brasil, as espécies que apresentam maior incidência são *L. amazonensis* e *V. braziliensis*. (MOSCHIN *et al.*, 2013).

A LC ocorre nas formas clínicas principais cutânea localizada, muco-cutânea e cutânea-difusa. (SANTOS *et al.*, 2014; WHO, 2014). Na primeira, a lesão começa com uma pápula no local da picada. Essa pápula aumenta lentamente até formar uma úlcera crônica de fundo granuloso e bordas salientes. Uma ou mais úlceras podem se desenvolver, tendo ou não a cura de maneira espontânea (FIGURA 4). A segunda inicia-se com úlceras simples, sendo elas parciais ou totais. Se não tratadas adequadamente, podem causar metástases e destruir as membranas mucosas do nariz, boca e garganta, cavidades e tecidos circundantes. Não se curam espontaneamente e podem levar a complicações respiratórias ou infecções bacterianas secundárias (FIGURA 5). (MENEZES, 2014; SEGER, 2014; WHO, 2014). E na terceira, produzem-se nódulos múltiplos, não ulcerados, disseminados e com elevado grau de parasitismo. A infecção não induz a uma resposta imune celular, sendo mais difícil de tratar (FIGURA 6). (SEGER, 2014; PEREIRA, 2015).

FIGURA 4 - FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA



FONTE: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2010).

FIGURA 5 - FORMA MUCO-CUTÂNEA



FONTE: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2010).

FIGURA 6 - FORMA CUTÂNEA-DIFUSA



FONTE: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2010).

A LC era considerada uma zoonose de animais selvagens, sendo transmitida acidentalmente ao homem quando este adentrava nas florestas para exploração, extração de madeira, abertura de estradas e mineração. (BATISTA *et al.*, 2013). Porém, essas mudanças ambientais somadas a um fluxo intenso de pessoas infectadas e animais domésticos, provavelmente deram lugar a disseminação do parasito e seu vetor nesse contexto. (AGUIAR *et al.*, 2014).

As áreas endêmicas para LC estão associadas à baixa renda, constitui-se em um problema de saúde pública e, acredita-se que o número de casos notificados não traduz a evolução da doença em determinadas regiões. Isso ocorre devido à demora do paciente na procura do sistema de saúde, difícil diagnóstico, afecções inaparentes, variações da resposta imunológica, multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos e a não inserção correta de dados no próprio sistema de compilação. (NEGRÃO; FERREIRA, 2014). É comum que o conhecimento acerca da doença restrinja-se às vítimas da infecção ou àquelas que já tiveram casos na família, dificultando o controle e as estratégias para impedir a sua transmissão. A prevenção também tem sido um problema, uma vez que envolve fatores ecológico-ambientais, socioeconômicos, culturais e comportamentais. (SANTOS *et al.*, 2014).

Para enfrentar esta moléstia, torna-se necessário compreender a complexidade de fatores geográficos intervenientes para criação de mecanismos que respeitem todos esses contextos. (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

3.4.2 Leishmaniose visceral

A forma visceral da leishmaniose, também conhecida como kala-azar, atinge mais de oitenta países. Há registros da doença em todos os continentes, sendo que noventa por cento de todos os casos ocorrem em sete países, Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Sudão do Sul, Nepal e Sudão, e afeta milhões de cães na Europa, Ásia, norte da África e América do Sul. Na América Latina a doença está presente em doze países, sendo que noventa por cento dos casos ocorrem no Brasil. (KEDZIERSKI, 2011; WHO, 2014).

As espécies de *Leishmania* envolvidas na forma visceral fazem parte do “complexo *donovani*” e do “complexo *infantum*”. A *L. donovani* é encontrada na África e Ásia, enquanto que a *L. infantum* é encontrada na Ásia, África, como também na Europa Mediterrânea e Novo Mundo. O cão doméstico é considerado o principal reservatório desse parasito. (LOPES, 2014; NOGUEIRA, 2014). A visceralização de espécies dermatrópicas do parasito, como *L. amazonensis* e *L. tropica*, já foi descrita como uma complicação de condições imunossupressoras, como a Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A espécie *L. amazonensis* já foi isolada de lesões cutâneas simples, cutânea difusa e mucosa, bem como o

baço e medula óssea de pacientes que desenvolveram a LV no Brasil. (ASSIS, 2008).

A LV é uma zoonose potencialmente fatal, tendo sua letalidade de noventa e cinco por cento se não tratada. Essa forma atinge órgãos como fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos. (LISBOA *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Em humanos tem evolução rápida e causa sintomas clínicos como febre, perda de peso, perda de apetite, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, diarreia, dor abdominal, anemia, fadiga e palidez (FIGURA 7). (OLIVEIRA; GILBERT; BÔAS, 2013; LOPES, 2014; SEGER, 2014).

Nos cães, os sintomas clínicos incluem descamação, seborreia, onicogrifose, ulceração, alopecia, linfadenomegalia, caquexia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (FIGURAS 8 e 9). (MONTEIRO, 2014).

FIGURA 7 - PACIENTE COM HEPATOESPLENOMEGALIA



FONTE: <http://cczniteroirj.blogspot.com.br/2015/09/leishmaniose-visceral.html> (2015).

FIGURA 8 - CÃO SINTOMÁTICO COM CERATOCONJUNTIVITE



FONTE: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo (2006).

FIGURA 9 - CÃO SINTOMÁTICO COM ONICOGRIFOSE



FONTE: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo (2006).

Ao longo dos anos, a LV deixou de ser tipicamente rural e passou a ser um problema em muitas cidades. (BRAZIL *et al.*, 2012). A destruição ou transformação radical do habitat natural do vetor pelas atividades humanas, mais o fato dele ter a capacidade de se adaptar às condições socioambientais e modificar suas características originais, resultou nesse contexto. (FREITAS; FEITOSA, 2014). Tais modificações favorecem ainda mais a sobrevivência dos parasitos, onde o cão é o principal reservatório, e, por conseguinte, é o principal mantedor da cadeia epidemiológica, podendo ou não desenvolver o quadro clínico da doença. (LISBOA *et al.*, 2014).

Em virtude dessas características, as estratégias de controle dessa endemia ainda são pouco efetivas. Elas estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, borrifação com inseticida contra o vetor e diagnóstico e eliminação dos cães positivos, pois, no Brasil, a eutanásia é recomendada pelo Ministério Da Saúde (MS) como medida de controle. (CALDAS *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Modelos matemáticos sugerem que esses programas de eliminação de animais falham por causa da alta incidência de infecção canina, da baixa sensibilidade dos testes diagnósticos e da demora entre o diagnóstico e a remoção realizada pelos serviços de saúde pública. (NOGUEIRA, 2014).

A LV tem sido identificada como uma infecção emergente entre os viajantes e representa um grande desafio para os profissionais na área de saúde humana e animal, devido à falta de familiaridade de ambos em países não endêmicos para com a doença. (KEDZIERSKI, 2011). O estudo epidemiológico, esclarecimentos sobre a transmissão, prevenção e controle da infecção devem ser passados à

população, com a intenção de controlar ou sanar a emergência e reemergência dessa doença. (IGARASHI *et al.*, 2014).

3.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico das leishmanioses baseia-se nos dados epidemiológicos (área endêmica ou área silenciosa), clínicos e laboratoriais. (HIRSCHMANN *et al.*, 2015). O diagnóstico parasitológico da LC é feita pela biópsia do material biológico coletado da borda da lesão, pelo exame histopatológico da lesão ou pela cultura do parasito.

Os exames imunológicos empregados para o diagnóstico da LC são: a Intradermorreação De Montenegro (IDRM), a Reação De Imunofluorescência Indireta (RIFI), o ELISA e o imunocromatográfico (fluxo lateral). Para a IDRM é utilizado o antígeno total de *L. amazonensis*, enquanto que os kits para os testes RIFI e ELISA usam antígenos complexos de *Leishmania* spp. Esses kits são produzidos por Biomanguinhos e adotados pela rede pública, no entanto, não estão à venda para os laboratórios privados. (ANTONIO, 2012).

Apesar da IDRM ser um teste comumente usado para LC, Borges *et al.* (2002) e Romero *et al.* (2004), utilizaram-no com pacientes que tiveram antecedentes de contato com a LV, humana ou canina, ainda com antígeno total de *L. amazonensis*.

Souza *et al.* (2005), avaliaram o perfil de anticorpos de pacientes humanos com LC. Os perfis das classes de imunoglobulinas foram analisados pelo teste ELISA, utilizando antígeno total de *L. amazonensis*. Observou-se que 97%, 94,6%, 57,5% e 21,5% das amostras testadas apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* das classes IgE, IgG, IgA e IgM, respectivamente. Os anticorpos IgE anti-*Leishmania* tinham alta avidéz, enquanto que IgG e IgA anti-*Leishmania* tinham média avidéz. A variação do perfil de isótipos, bem como a avidéz das imunoglobulinas refletiu a complexidade da resposta imune humoral contra a LC.

Szargick *et al.* (2009), usaram para os testes RIFI, ELISA e *western blotting*, em humanos, os antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Os autores mostram que há reações cruzadas entre as diferentes espécies de *Leishmania*.

Mais recentemente vêm sendo usados testes moleculares para o diagnóstico da LC, como a Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR), para a confirmação do Ácido

Desoxirribonucleico (DNA) do parasito, porém não diferenciando se o mesmo está vivo ou não. (BATISTA *et al.*, 2013).

Para a LV, a clínica é sugestiva, mas necessita-se de confirmação por exame parasitológico ou sorológico. Para o parasitológico é realizado uma punção de gânglios e/ou medula óssea. (CALDAS *et al.*, 2013). Para cães, o material de eleição para a coleta é do gânglio poplíteo.

Os testes sorológicos para a LV são muito empregados pela facilidade de execução, rapidez e alta sensibilidade. Em 2011, o MS preconizou um novo protocolo, utilizando o Teste Rápido Para Leishmaniose Visceral Canina (TR DPP® (imunocromatográfico)) como triagem rápida e o teste ELISA como confirmatório. (POSSAS, 2012; BATISTA *et al.*, 2013; SILVA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A PCR pode ser empregada como teste molecular para LV na procura do DNA do parasito. (CALDAS *et al.*, 2013).

Os testes utilizados apresentam eficácia, mas também desvantagens. A IDRM, por utilizar promastigotas, pode limitar a especificidade do teste e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas. Além disso, a prova permanece positiva em pessoas que já tiveram a doença, não permitindo a diferenciação de casos novos e antigos. (ARAÚJO, 2014; SEGER, 2014).

Resultados de José *et al.* (2001), demonstram que o teste de Montenegro induz, além de hipersensibilidade tardia, a produção de γ -IFN (Interferon-gama). O γ -IFN está envolvido na regulação das respostas imunológicas, recrutando leucócitos para o local da infecção e estimulando os macrófagos para eliminar bactérias, parasitos ou vírus.

Nos testes sorológicos há grande variação na sensibilidade e especificidade, o que leva a taxas de infecções subestimadas, permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas. (LANA, 2014).

E, para a PCR, por ser um método extremamente sensível, seu maior inconveniente é o risco de resultados falso positivos ou contaminação por produtos previamente amplificados. Além de necessitar de equipamentos que são caros e ainda não disponíveis em todos os laboratórios da rede pública. (BATISTA *et al.*, 2013; SEGER, 2014; PEREIRA, 2015).

Apesar da variedade de métodos, não há um que possa ser adotado como padrão ouro para o diagnóstico de LC e LV. (SEGER, 2014). Diante disso, percebe-

se a necessidade no desenvolvimento de métodos mais específicos e acessíveis para as leishmanioses, visando beneficiar o maior número de pessoas e animais, especialmente as que têm dificuldades no acesso ao diagnóstico.

Para o tratamento das leishmanioses, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb+5). Há dois tipos deles, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil. Não havendo resposta satisfatória com o pentavalente, os medicamentos de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (isotionato (di-B-hidroxietano sulfonato) e mesilato (di-B-hidroximetil sulfonato)). Porém, a anfotericina B é considerada como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes. Já a anfotericina B lipossomal é uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas, feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nesse conjunto, o fármaco atinge níveis plasmáticos mais elevados que o fármaco convencional. A Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza a utilização desse medicamento para o tratamento da LV. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Com relação a LV, além do tratamento das pessoas infectadas com as drogas já citadas, o uso de inseticidas em área de transmissão para o controle do vetor e a eliminação de cães soropositivos são medidas adotadas. A norma atual do MS recomenda que cães infectados sejam eutanasiados, uma vez que ainda não há tratamento comprovado para obter-se cura parasitológica permanente nos animais. O uso de medicamentos para farmacoterapia em humanos, apresenta, nos animais, ineficácia comprovada e não é recomendado pelo MS. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006, 2014; NOGUEIRA, 2014).

3.6 PEPTÍDEOS

O diagnóstico sorológico das leishmanioses, pelos testes atualmente disponíveis, apresenta problemas em relação à sensibilidade e especificidade. Diante disso, percebe-se a necessidade no desenvolvimento de métodos mais sensíveis e de fácil execução, visando beneficiar o maior número de pacientes. (NOGUEIRA, 2014).

Os peptídeos são polímeros de aminoácidos unidos a partir da ligação peptídica. Combinações dos vinte aminoácidos existentes, em sequências

diferentes, dão origem aos mais variados produtos, como enzimas, hormônios, transportadores, anticorpos, entre outros. Os grandes peptídeos constituem as proteínas, que possuem extrema importância biológica. (NELSON; COX, 2006).

A identificação de epítomos antigênicos vem sendo utilizada para a descoberta de antígenos que possam ser aplicados como ferramenta alternativa para detecção de anticorpos específicos contra o parasito. (PAIVA, 2016).

Um estudo feito por Mendes *et al.* (2013), identificaram epítomos de células B lineares conservados e polimórficos de *Trypanosoma cruzi* que pudessem ser utilizados para sorodiagnóstico da doença de Chagas. Um conjunto de cento e cinquenta peptídeos foi ligado covalentemente a uma membrana, porém, trinta e seis foram considerados reativos. Quatro desses peptídeos foram testados contra um painel de pacientes chagásicos utilizando o teste ELISA. Um peptídeo conservado apresentou sensibilidade de 95,8% e 88,5% de especificidade. Portanto, este peptídeo, em associação com outros antígenos do *Trypanosoma cruzi*, pode melhorar o sorodiagnóstico da doença.

Faria *et al.* (2011), identificaram e testaram novos antígenos para o sorodiagnóstico de LV em cães. As proteínas imunodominantes de *L. infantum* foram mapeadas *in silico* para prever epítomos de células B. De trezentos e sessenta peptídeos selecionados, apenas dez peptídeos se mostraram mais reativos frente o teste ELISA. A sensibilidade e especificidade desses peptídeos foram comparadas ao kit EIE-LVC Biomanguinhos, e, ambas se mostraram mais elevadas (88.70% e 95.00%, respectivamente) do que as do kit (13.08% e 100.00%, respectivamente). Conclui-se que o ELISA, utilizando peptídeos sintéticos, é uma técnica com grande potencial para diagnosticar LV em cães.

Bottino *et al.* (2013), identificaram epítomos no Antígeno Repetitivo Citoplasmático (CRA) e proteínas Antígeno Repetitivo Flagelar (FRA) de *Trypanosoma cruzi* utilizando técnicas peptídicas sintéticas e soros agrupados de pacientes chagásicos. Os epítomos foram avaliados por ELISA baseados em peptídeos sintéticos. Vinte e dois peptídeos foram analisados por matriz de síntese de *spot*. Essa matriz identificou com sucesso dois determinantes antigênicos de IgG na proteína CRA e quatro em FRA. Após outro ELISA, os antígenos de CRA demonstraram sensibilidade e especificidade de 100%, enquanto o antígeno FRA apresentou sensibilidade de 91,6% e especificidade de 60%. Os dados sugerem fortemente que as sequências de CRA seriam úteis para o desenvolvimento de

reagentes de diagnóstico que poderiam melhorar a sensibilidade e a especificidade dos testes atualmente disponíveis.

Souza *et al.* (2015), mapearam um epítipo linear de células B dentro da proteína semelhante à Catepsina L de *L. braziliensis*. Um peptídeo sintético contendo o epítipo e uma proteína recombinante foram avaliados para sorodiagnóstico de LC e LV em humanos e LV em cães. A proteína recombinante apresentou melhor desempenho para a LC em humanos e LV em animais, com 96,30% e 89,33% de acurácia, respectivamente. O peptídeo sintético foi o melhor para discriminar a LV humana, com 97,14% de especificidade, 94,55% de sensibilidade e 96,00% de acurácia. Os resultados sugerem um potencial uso desses novos antígenos para o diagnóstico das leishmanioses.

Na busca por antígenos com o potencial de diagnóstico para hanseníase, Geluk *et al.* (2009), analisaram cinco proteínas recombinantes (ML1989, ML1990, ML2283, ML2346 e ML2567) e vinte e dois peptídeos sintéticos. Os resultados mostraram que todas as proteínas e três dos peptídeos sintéticos, foram reconhecidos fortemente pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes. Nessa mesma linha de pesquisa, Duthie *et al.* (2010), identificaram vários antígenos recombinantes e produziram uma quimera. Em ambos os estudos, os dados apontam para um potencial uso desses novos antígenos no diagnóstico da hanseníase.

No estudo feito por Souza *et al.* (2014 b), investigaram o uso potencial de uma proteína recombinante (r Peroxidoxina) de *L. braziliensis* como um antígeno para o imunodiagnóstico da LC e LV em humanos e LV em cães. O teste ELISA demonstrou que os indivíduos com LC e LV apresentaram níveis elevados de anticorpos contra r Peroxidoxina, permitindo a identificação dos infectados. Outro ELISA de r Peroxidoxina mostrou maior capacidade de discriminação entre animais vacinados e infectados. Em geral, os dados demonstraram que r Peroxidoxina é uma das moléculas alvo que pode ser usada como antígeno no diagnóstico de diferentes espécies de *Leishmania*.

Whelan *et al.* (2010), reavaliaram o potencial de antígenos como reagentes de teste cutâneo para Diferenciação De Animais Infectados Dos Vacinados (DIVA) em bovinos. Um *cocktail* do *Mycobacterium tuberculosis* proteína recombinante complexo antigênico ESAT-6, CFP-10, MPB70 e MPB83 induziu respostas de hipersensibilidade tardia em 78% dos bovinos infectados, porém, o *cocktail* não

induziu respostas cutâneas em bovinos vacinados com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, a utilidade de peptídeos sintéticos como antígenos de teste de pele promissores para tuberculose bovina para DIVA, fornecendo dados promissores para o desenvolvimento futuro de testes cutâneos para DIVA.

Há uma proteína de superfície de merozoíto candidata a vacina 3 (MSP3) para malária. Em seu estudo, Sirima *et al.* (2009), avaliaram a segurança e a imunogenicidade dessa vacina em crianças com idades entre 12-24 meses, residentes em área endêmica. Todas as crianças inscritas receberam três doses da vacina MSP3. Os regimes de doses de MSP3 foram capazes de provocar elevados níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-MSP3 específicos, com pouco ou nenhum aumento nas classes IgG2, IgG4 e IgM. Isso significa que a vacinação induziu predominantemente os isótipos envolvidos no mecanismo dependente de monócitos de *Plasmodium falciparum*. Apesar da promessa de MSP3 como candidato à vacina contra a malária, uma avaliação adicional da eficácia desta deve ser realizada.

O *phage display* é uma técnica que utiliza a expressão de peptídeos na superfície de fagos. A ligação direta e de elevada especificidade que ocorre entre a superfície do fago e a molécula alvo é a principal vantagem. Assim, é possível realizar a seleção de epítomos com potencial para serem usados como antígenos vacinais ou no imunodiagnóstico de várias doenças. Essas moléculas são estáveis e não dependem de cultivo em meios específicos para sua produção. (SEGER, 2014; SOUZA *et al.*, 2014 a; PAIVA, 2016).

Essa técnica é utilizada num estudo feito por Costa *et al.* (2014), onde identificaram peptídeos específicos a anticorpos de *L. infantum*. Dezoito clones foram identificados e suas reatividades testadas por ELISA frente aos soros de cães portadores de LV. Oito clones apresentaram sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos de 100%. A utilização destes mimótopos por ELISA provou ser um ensaio reprodutível, acessível, rápido e barato, e pode ser aplicado em programas de monitorização da LV.

3.7 PHAGE DISPLAY

A técnica *phage display* foi desenvolvida para mapear locais de ligação dos anticorpos aos antígenos a partir de bibliotecas randômicas de fagos. As bibliotecas

são uma mistura heterogênea de clones de fagos, cada um carreando diferente inserto de DNA fita simples e exibindo um peptídeo diferente na sua superfície. Os peptídeos são expressos em bacteriófagos filamentosos como o M13, f1, fd e outros. (SANTOS, 2010; SEGER, 2014).

O *biopanning* é uma metodologia que permite selecionar peptídeos ou outras biomoléculas com diversas finalidades. A seleção é realizada por incubação da biblioteca de peptídeos apresentados em fagos com o alvo imobilizado em uma placa de microtitulação. Os fagos contendo peptídeos com afinidade pelo alvo são capturados e permanecem ligados, e, os fagos não ligados são eliminados por sucessivas lavagens. A adequada adstringência dos tampões de lavagem durante os ciclos de seleção é necessária para o sucesso na seleção dos clones com alta afinidade. Os ligantes ao alvo são eluídos com uma solução que destrói ou enfraquece as ligações peptídeo-alvo, produzindo um eluato enriquecido com clones de alta afinidade. Esse conteúdo infectará células bacterianas hospedeiras (*Escherichia coli*) dando origem a um amplificado. Então, os fagos obtidos dessa etapa são titulados e submetidos a um novo ciclo (ligação ao alvo, eluição e amplificação) para selecionar mais sequências específicas. Após três ou quatro ciclos, os clones individuais são sequenciados e as sequências de aminoácidos traduzidas. A afinidade dos fagos para o receptor-alvo pode ser avaliada por testes imunológicos, como o teste ELISA, para demonstrar a reatividade dos clones selecionados contra o alvo de interesse. (SANTOS, 2010; COSTA *et al.*, 2014; SEGER, 2014).

O *phage display* serve como base para a descoberta de epítomos descontínuos, sendo possível selecionar um mimotopo. Um mimotopo é uma macromolécula, geralmente um peptídeo, que imita a estrutura do epítopo antigênico. Devido a essa semelhança, causa uma resposta aos anticorpos similar à gerada pelo epítopo. Um anticorpo específico para um determinado epítopo antigênico reconhece também o mimotopo que imita esse epítopo. É uma estratégia que vem sendo usada para identificar peptídeos com potencial para diagnósticos e vacinas. (ALBAN, 2011; PEIXOTO, 2011; SILVA, 2013; THOMAZ-SOCCOL; ALBAN; SEGER, 2015).

3.8 ELISA

O teste ELISA é o método diagnóstico mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas, por meio do Programa de Controle de Leishmanioses do Ministério da Saúde. (LOPES, 2014). Este é um teste rápido, de alta sensibilidade quando usado antígenos totais, que permite analisar um grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. É um método útil para estimar concentrações de matérias na ordem de $\mu\text{g/mL}$ a pg/mL em soluções como soro, urina, esperma e sobrenadante de células. Pode ser adaptado para a detecção e quantificação de substâncias como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios, sejam eles totais, sintéticos ou recombinantes. (POSSAS, 2012; SILVA, 2013; SOUZA *et al.*, 2013).

Existem três principais metodologias que formam a base de todos os ELISAs, o direto, o indireto e o sanduíche. Esse teste consiste em adsorver o antígeno de interesse, juntamente com um tampão de carbonato (processo conhecido como sensibilização) à superfície interna de uma microplaca de titulação com noventa e seis poços. Uma lavagem é realizada. Posteriormente, é feito o bloqueio com uma proteína, para que esta ocupe os espaços livres a fim de evitar que os sítios inespecíficos possam gerar resultados falso positivos ou negativos. Outra lavagem é realizada. A superfície é então exposta à amostra e a reação antígeno-anticorpo ocorrerá. Após uma terceira lavagem, um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, é adicionado. Esse anticorpo possui uma enzima acoplada que irá produzir uma substância colorida em presença de um substrato. Após o bloqueio da reação enzimática, a coloração amarela é lida fotometricamente. (POSSAS, 2012; SILVA, 2013).

O teste é considerado de fácil execução, pois não depende de conhecimentos técnicos, e possui leitura objetiva dos resultados, sendo capaz de detectar baixos títulos de anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro. (SANTARÉM *et al.*, 2010; MENEZES, 2014). Contudo, sua especificidade varia de acordo com o antígeno utilizado e com o estado clínico dos cães (especialmente os assintomáticos), podendo resultar num falso negativo. Por se tratar de um teste que identifica a reação antígeno-anticorpo, o mesmo poderá identificar infecção passada, causada por patógenos relacionados, como *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia*

canis e *Brucella canis* ou em cães vacinados, apresentando um resultado falso positivo. (SANTARÉM *et al.*, 2010; LOPES, 2014).

Estudo feito por Santarém *et al.* (2010), apresentaram dados sobre o desenvolvimento de técnicas baseadas em ELISA, para a detecção de anticorpos contra a proteína recombinante LicTXNPx e comparação dos resultados com aqueles que empregam antígenos totais de *Leishmania*. Os resultados demonstraram que, os ELISAs com base em antígenos totais tinham níveis mais elevados de sensibilidade para a detecção de anticorpos em cães sintomáticos ou assintomáticos, do que para a detecção de aqueles contra proteínas recombinantes isoladas. No entanto, verificou-se que as especificidades eram semelhantes para todos os antígenos alvo utilizados.

Souza *et al.* (2013), utilizaram o ELISA frente aos soros de pacientes com LC contra diferentes proteínas recombinantes (rHSP70, rH2A, rH2B, RH3, RH4 e rKMP11). Entre as proteínas recombinantes, rHSP70 e rH2A mostraram a melhor reatividade contra os soros. Esses resultados levantam a possibilidade de usar rHSP70 para o sorodiagnóstico de LC.

Para o aprimoramento desse teste, antígenos purificados vêm sendo desenvolvidos para que se possa obter uma forma segura e eficaz do diagnóstico para as leishmanioses. (SANTARÉM *et al.*, 2010; SEGER, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A aprovação ética do presente estudo foi obtida junto ao Comitê de Ética da UFPR (sob o número 684.244), ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo 107/11) e ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (UFPR 044/2014).

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.2.1 Amostras de soro humano

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes com suspeitas clínicas compatíveis para LC, provenientes do Hospital de Clínicas da UFPR e de Regionais de Saúde do Paraná. Foram coletadas também amostras de sangue de indivíduos saudáveis que não apresentaram histórico de leishmaniose, nem moravam em zona endêmica, para os controles negativos. A confirmação dos pacientes positivos e negativos deu-se pelo teste ELISA e isolamento em meio de cultura.

Para a obtenção do soro, após a coleta do sangue, foi realizada uma centrifugação 3.500 g por dez minutos. O soro foi transferido para um microtubo e estocado em freezer -20°C para posterior emprego em exames sorológicos.

4.2.2 Amostras de soro canino

Amostras de sangue de cães com suspeitas clínicas compatíveis para LV foram coletadas de animais residentes em Foz do Iguaçu, Paraná. Amostras de sangue de animais provenientes de zona não endêmica também foram coletadas para serem utilizadas como controle negativo. As amostras de soro selecionadas, tanto positivas como negativas, tiveram como base o resultado do TR DPP®, do teste ELISA e isolamento em meio de cultura.

Informações referentes aos animais utilizados no estudo foram registradas em um banco de dados, incluindo nome, raça, sexo, idade, local de origem e antecedentes clínicos.

Para a obtenção do soro, após a coleta do sangue, foi realizada uma centrifugação 3.500 *g* por dez minutos. O soro foi transferido para um microtubo e estocado em freezer -20°C para posterior emprego em exames sorológicos.

4.3 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *L. braziliensis* e *L. infantum*

A obtenção de antígeno total das espécies de *Leishmania* visou sua utilização nos testes de imunodiagnóstico.

Para o cultivo das formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foi utilizado o Meio Bifásico Novy-Mcneal-Nicolle (NNN), suplementado com 10% de sangue de coelho e solução salina fisiológica 0,9% esterilizada (para permitir multiplicação na fase líquida).

Para cada espécie uma cepa referência foi utilizada. Para *L. braziliensis* foi usada a cepa MHOM/BR/75/M2904 e para *L. infantum* foi usada a cepa MHOM/FR/78/LEM75. A cultura, de ambas as espécies, foi inicialmente realizada em tubo de ensaio com meio NNN para o descongelamento. Para a ampliação da cultura foram realizadas repicagens sucessivas até chegar em 10⁷ promastigotas. Para o aumento de escala, quatro tubos contendo formas promastigotas foram incubados em um erlenmeyer de 100 mL, incluindo 20 mL de meio NNN+10% de sangue de coelho. Cada repique teve um período de incubação de sete dias, para *L. braziliensis*, e cinco dias, para *L. infantum*, possibilitando o aumento do número de parasitos. Após essa etapa, o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado em gaze esterilizada e transferido para um falcon de 50 mL, seguido de centrifugações a 1.500 *g* por cinco minutos a 4°C. Entre essas centrifugações, lavagens com solução fisiológica 0,3% e 0,9% foram feitas para a eliminação do meio de cultura restante, lise das hemácias e remoção da hemoglobina do coelho. Ao final desse processo, o sedimento foi homogenizado com água destilada. Para a lise completa dos protozoários, foram realizados seis ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C em banho-maria) súbitos. Mantendo o antígeno conservado em banho de gelo, foi aplicada a ação do Ultra-Som Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlim, Alemanha) a 150 W por seis séries de trinta segundos com intervalos de um minuto. O produto resultante foi centrifugado a 9.000 *g* por trinta minutos a 4°C, os sobrenadantes foram recuperados e as proteínas dosadas pelo método de Lowry

(1951). Foram feitas alíquotas dos conteúdos antigênicos produzidos e armazenadas em microtubos a -20°C para uso nos posteriores experimentos.

4.4 ANTÍGENOS TOTAIS OBTIDOS TESTADOS POR ELISA

Os antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram testados por ELISA para a confirmação da reatividade antígeno-anticorpo e padronização.

Para esse teste utilizou-se uma placa de 96 poços (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA). Foram testadas duas concentrações do antígeno total de *L. braziliensis* (2,5 e 5 µg/mL). A placa foi sensibilizada ao se pipetar 100 µL do antígeno, por poço, em diferentes concentrações, em *coating buffer* (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,29%, pH 9,6) e deixada *overnight* a 4°C. A solução inicial foi descartada e a placa lavada com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. O bloqueio foi realizado ao se pipetar 120 µL da solução de bloqueio (2% de caseína em PBS (Tampão Fosfato Salino) pH 7,4) em cada poço e incubado por uma hora a 37°C. Uma nova lavagem foi realizada, adicionando agora 100 µL dos soros diluídos (1:100 e 1:200) em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4, Tween 20 0,05%), por poço, incubando a 37°C por uma hora. Mais uma lavagem foi realizada para a adição de 100 µL, por poço, do conjugado anti-IgG humano peroxidase (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) diluído (1:10.000 e 1:20.000) em tampão de incubação, deixado a 37°C por uma hora. Após a última lavagem, foi preparado o substrato, composto por duas pastilhas do cromógeno OPD (Dicloridrato De O-Fenilenodiamina 2 mg (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)) diluído em 10 mL de tampão citrato (0,15 M, pH 5,0) e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Essa solução foi distribuída na placa ao se pipetar 100 µL por poço e deixada a quinze minutos ao abrigo da luz. Depois, inibiu-se a reação com a adição de 20 µL de ácido sulfúrico (1:20) por poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

O procedimento realizado para a padronização do antígeno total de *L. infantum* foi o mesmo descrito acima. Foram testadas duas concentrações de proteína (1,25 e 2,5 µg/mL), de soro (1:100 e 1:200) e de conjugado (1:10.000 e 1:20.000). A diferença desse teste foi a utilização de soro canino e conjugado anti-IgG cão peroxidase (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA).

Os soros humanos e caninos, manipulados para a padronização de ambos os antígenos totais nessa etapa, eram controles positivos e negativos já existentes, utilizados para testes de rotina do LBMEBB. As concentrações de proteína, as diluições do soro e do conjugado testadas são concentrações e diluições pré-estabelecidas, usadas para as padronizações dos antígenos totais produzidos no mesmo laboratório citado.

4.5 SELEÇÃO DE PACIENTES POSITIVOS

4.5.1 Pacientes humanos

Para a pré-seleção dos soros, foi analisado os resultados de um teste ELISA e de isolamento de cultura de dezenove pacientes. Esses resultados, quando comparados, mostraram-se discordantes para com alguns pacientes. Diante disso, um novo ELISA foi realizado para que houvesse comparação e, assim, pudesse selecionar apenas os soros positivos nos três resultados e com maiores títulos de anticorpos (dados mostrados na TABELA 2).

Para o segundo teste ELISA, descrito no item 4.4, foi utilizado antígeno total de *L. braziliensis* (2,5 µg/mL), frente aos soros de pacientes (1:100) e conjugado anti-IgG humano peroxidase (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) (1:10.000). Todos foram testados em duplicata.

Para determinação do limite de corte (*Cut-off*) do teste, a média obtida das absorbâncias foi somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido.

4.5.2 Pacientes caninos

Para a pré-seleção dos soros, os animais foram divididos em quatro grupos de dez cada, onde foram analisados os resultados de um teste ELISA, do teste TR DPP® e do isolamento de cultura (TABELA 1).

TABELA 1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE CÃES PARA PRÉ-SELEÇÃO DOS SOROS

GRUPOS	CÃES
+ ELISA, TR DPP® e cultura	10
+ ELISA, TR DPP® - Cultura	10
- ELISA, TR DPP® e cultura (Foz do Iguaçu – PR)	10
- ELISA, TR DPP® e cultura (Curitiba – PR)	10

FONTE: O autor (2016).

Após análise dos dados, foi realizado um segundo teste ELISA, descrito no item 4.4, para que pudesse comparar os resultados e agrupar os soros positivos e com maiores títulos de anticorpos. Para isso, foi utilizado antígeno total de *L. infantum* (1,25 µg/mL), frente aos soros de cães (1:200) e conjugado anti-IgG cão peroxidase (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) (1:10.000). Todos foram testados em duplicata.

Para determinação do limite de corte (*Cut-off*) do teste, a média obtida das absorbâncias foi somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido.

4.6 PHAGE DISPLAY

O trabalho aqui descrito foi desenvolvido inicialmente por Thomaz-Soccol, Alban e Seger (2015) até a fase de síntese química dos peptídeos miméticos. As etapas realizadas para a busca de epítomos miméticos estão citadas na FIGURA 10.

Para a busca de epítomos miméticos, por *phage display*, primeiramente camundongos Balb C foram infectados com *L. amazonensis* (10^7 promastigotas). Os parasitos foram inoculados na pata posterior. Após trinta a sessenta dias, com o aparecimento de lesões e comprovação da doença por isolamento do parasito, foi coletado o sangue dos animais para separação do soro. Depois da realização do teste ELISA e confirmação da reação antígeno-anticorpo, os soros foram reunidos em um *pool* (altos títulos de anticorpos em uma mesma amostra) para a seleção de epítomos miméticos. As seguintes etapas foram realizadas: 1) purificação e seleção de anticorpos anti-*L. amazonensis* (precipitação, cromatografia, *western blotting*); 2) seleção de peptídeos utilizando *phage display*, clonagem dos fagos, teste ELISA para seleção dos fagos mais reagentes, sequenciamento desses fagos, síntese química de peptídeos e avaliações imunológicas (FIGURA 10). Para o

desenvolvimento da etapa 2, os clones de fagos amplificados em *Escherichia coli* foram submetidos à extração do DNA pelo kit Qiagen 27704 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A análise das sequências do DNA proveniente do uso do sequenciador automático ABI PRISM 377 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foi processada em *software* do próprio equipamento. Após a identificação do DNA viral, foi utilizado o programa *Proteomics Tools* para obtenção da sequência de aminoácidos codificada pelo segmento de DNA inserido no fago, bem como para obter o peso estimado de cada peptídeo.

Uma vez selecionados, os peptídeos foram quimicamente sintetizados pela estratégia Fmoc, utilizando um protocolo de síntese peptídica em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que envolve aminoácidos especiais para síntese *in vitro*. O agrupamento amino destes aminoácidos é protegido pelo agrupamento Fmoc e são acoplados à resina. A cadeia lateral também é protegida por um grupo protetor para prevenir reações indesejadas. O protocolo foi realizado de acordo com Merrifield (1969), utilizando o sintetizador automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha).

A técnica consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo a um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por sucessivas adições de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Os ciclos de acoplamento (aminoácidos com os seus ativadores) e desproteção (remoção do grupo Fmoc pela presença de 20% de piperidina) foram realizados até que todos os aminoácidos do peptídeo estivessem acoplados. Após a conclusão do último ciclo, os peptídeos, que não tem mais o grupo Fmoc do último aminoácido, foram removidos da resina por um processo chamado clivagem. Este passo também remove os grupos protetores da cadeia lateral. Esta solução é então filtrada e precipitada com éter etílico frio, produzindo o peptídeo. Após centrifugação, o éter foi rejeitado de acordo com as normas de biossegurança. Os peptídeos foram liofilizados.

FIGURA 10 - PRINCIPAIS ETAPAS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS REALIZADO NO LBMEBB



FONTE: O autor (2016).

4.7 ANÁLISE IN SILICO DOS PEPTÍDEOS

A análise *in silico* foi feita por meio do programa *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB, 2016) para a previsão de antígenos lineares, acessibilidade, antigenicidade, flexibilidade e hidrofobicidade. Para cada parâmetro era obtido um escore. Os peptídeos que apresentassem os maiores escores seriam avaliados no teste ELISA.

4.8 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

A diluição dos peptídeos foi realizada por meio do acréscimo de 1 mL de PBS pH 7,4, posteriormente, feitas suas dosagens pelo kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenados a -20°C. Após, os peptídeos foram testados por ELISA. O objetivo desse teste foi avaliar a

eficiência dos peptídeos na identificação de LC por *L. braziliensis* e LV por *L. infantum*, para um potencial uso no imunodiagnóstico.

Para o teste dos peptídeos foram usadas três concentrações dos mesmos (1, 0,5 e 0,25 µg/mL), quatro diluições dos soros (1:200, 1:400, 1:600 e 1:800) e duas diluições do conjugado (1:7500 e 1:10.000), como mostra a FIGURA 11.

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DE UMA MICROPLACA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS QUANTO À SUA CONCENTRAÇÃO IDEAL, DILUIÇÕES DOS SOROS POSITIVO E NEGATIVO E CONJUGADO

	Peptídeo 1						Peptídeo 2						
1:200	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1:10.000
1:400	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
1:600	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
1:800	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
1:200	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1:7.500
1:400	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
1:600	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
1:800	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	1 µg/mL		0,5 µg/mL		0,25 µg/mL		1 µg/mL		0,5 µg/mL		0,25 µg/mL		

NOTA: Os números na figura ao lado esquerdo representam as diluições dos soros testadas. Os números ao lado direito representam as diluições do conjugado. Os números abaixo indicam as concentrações de cada peptídeo por poço. Os símbolos de + e – dentro da figura representam soros controles positivos e negativos, respectivamente.

FONTE: O autor (2016).

A metodologia usada é a mesma descrita no item 4.4. Para testarmos doze peptídeos frente aos soros humanos e caninos, seis placas como essa (FIGURA 11) foram feitas, cada qual contendo dois peptídeos. Para ambos os soros, foi feito o *pool* de positivos e negativos, tendo como base os resultados obtidos no teste descrito em 4.5.1 e 4.5.2. Esse *pool* possibilitou o manuseio de altos títulos de anticorpos.

Para melhor avaliação da eficiência dos peptídeos em diferenciar um soro positivo de um negativo, a partir de suas absorbâncias, um cálculo foi realizado com base no resultado do ELISA. Essa equação consiste em subtrair a absorbância do *pool* de soros negativos da absorbância do *pool* de soros positivos e dividir novamente pela absorbância do *pool* de soros positivos, como mostrado abaixo.

$$\text{ELISA score} = \frac{\text{Absorbância do } \textit{pool} \text{ positivo} - \text{Absorbância do } \textit{pool} \text{ negativo}}{\text{Absorbância do } \textit{pool} \text{ positivo}}$$

Esse cálculo foi usado para determinar qual ou quais peptídeos conseguiram diferenciar um soro positivo de um negativo, ou seja, quanto mais próximo do valor máximo de 1,0 para o “ELISA score”, mais específica é a reatividade dos anticorpos do soro frente ao peptídeo.

5 RESULTADOS

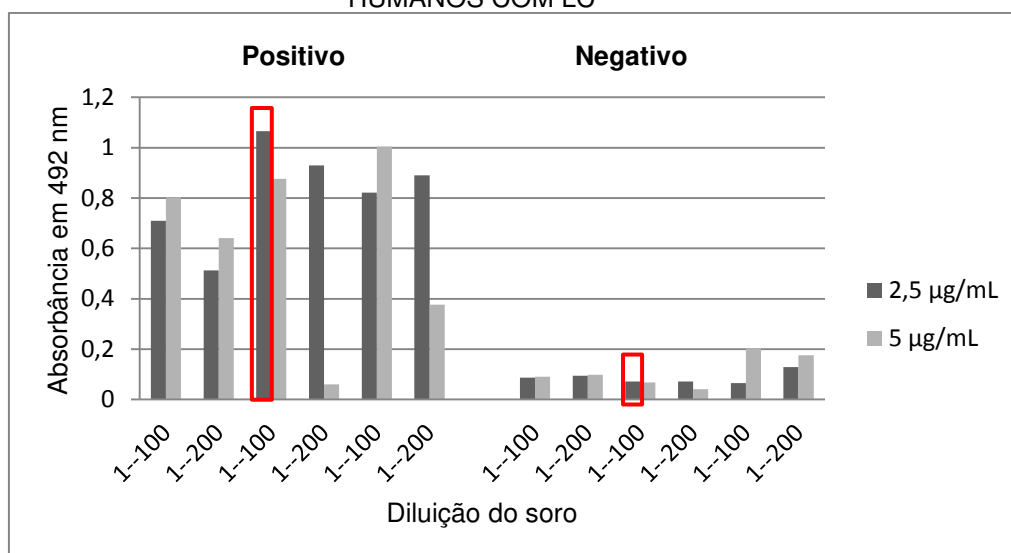
5.1 PADRONIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS TOTAIS

Após a realização da dosagem de proteínas, foram obtidos padrões de 2,46 mg/mL para o antígeno de *L. braziliensis* e 1,48 mg/mL para o de *L. infantum*. Os antígenos foram aliquotados (500 µL) e armazenados para os experimentos subsequentes.

Para a padronização dos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum*, foram usadas duas concentrações do mesmo e duas diluições dos soros, a partir do teste ELISA.

A FIGURA 12 mostra a padronização do antígeno total de *L. braziliensis* com o uso de soros de humanos. Em ambas as concentrações o antígeno mostrou-se eficaz na diferenciação entre o soro positivo e negativo. A melhor resposta foi observada na concentração do antígeno 2,5 µg/mL e diluição do soro 1:100. Obteve-se a absorbância do controle positivo 0,8 vezes maior em relação à absorbância do controle negativo.

FIGURA 12 - RESPOSTA DO ANTÍGENO TOTAL DE *L. braziliensis* FRENTE AOS SOROS DE HUMANOS COM LC



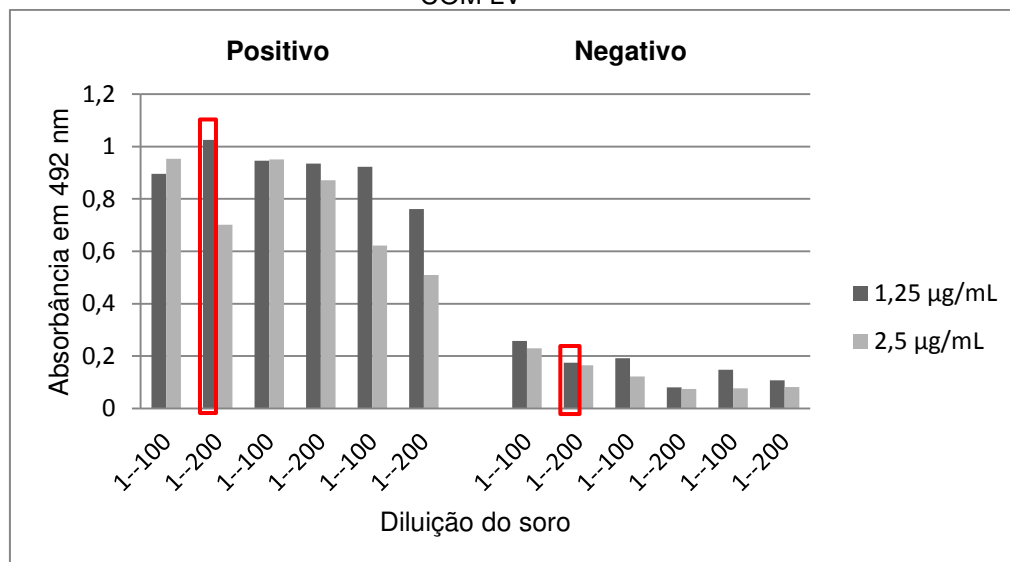
NOTA: Uma placa de ELISA foi sensibilizada com 2,5 µg/mL e 5 µg/mL de antígeno de *L. braziliensis* e incubada com soro humano positivo e negativo nas diluições 1:100 e 1:200. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Para a padronização do antígeno total de *L. infantum*, foram utilizados soros de cães. O resultado com maior diferença entre soros positivos e negativos foi a

concentração do antígeno 1,25 µg/mL e diluição do soro 1:200, onde a absorbância do controle positivo foi 0,9 vezes maior em relação a absorbância do controle negativo (FIGURA 13).

FIGURA 13 - RESPOSTA DO ANTÍGENO TOTAL DE *L. infantum* FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV



NOTA: Uma placa de ELISA foi sensibilizada com 1,25 µg/mL e 2,5 µg/mL de antígeno de *L. infantum* e incubada com soro canino positivo e negativo nas diluições 1:100 e 1:200. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG cão conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Os soros, tanto de humanos como de cães, manipulados nas padronizações dos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum*, eram controles positivos e negativos já existentes, utilizados para testes de rotina do LBMEBB.

5.2 SELEÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES POSITIVOS PARA AS LEISHMANIOSES PELO TESTE ELISA

5.2.1 Seleção de soros positivos de humanos com leishmaniose cutânea

Após a pré-seleção de dezenove soros, a partir do resultado de um ELISA e do isolamento de cultura, um segundo ELISA, utilizando antígeno total de *L. braziliensis*, foi realizado (TABELA 2).

TABELA 2 - SELEÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES POSITIVOS PARA LC

PACIENTES	1º ELISA	CULTURA	2º ELISA
P1	0,137	N	0,279
P2	0,368	N	1,1675
P3	0,381	N	1,1235
P4	0,172	N	0,3065
P5	0,27	P	0,5155
P6	0,15	P	0,4405
P7	0,529	P	0,7615
P8	0,517	P	0,719
P9	0,468	P	0,8435
P10	0,512	P	0,854
P11	0,561	P	0,754
P12	0,496	P	0,915
P13	0,22	P	0,5795
P14	0,35	P	0,8485
P15	0,953	P	0,889
P16	0,284	P	0,922
P17	0,656	P	0,6675
P18	0,231	N	0,981
P19	0,351	N	0,8215

NOTA: Letra N significa resultado negativo. Letra P significa resultado positivo. Os números na tabela se referem às absorvâncias dos testes ELISA realizados.

FONTE: O autor (2016).

A comparação dos resultados obtidos a partir de dois testes ELISA e do cultivo de parasitos possibilitou a confirmação de pacientes positivos para leishmaniose cutânea.

O primeiro ELISA teve como limite de corte (*Cut off*) a absorvância de 0,126, ou seja, todos os pacientes deram positivo. No isolamento de cultura, de dezenove pacientes, seis foram negativos. No segundo ELISA, o limite de corte (*Cut-off*) foi estipulado na absorvância 0,319, resultando em apenas dois pacientes negativos.

Para que pudesse selecionar apenas os soros com maiores títulos de anticorpos, para a composição de um *pool* que seria usado para o *screening* dos peptídeos, foram escolhidos os soros que positivaram para cultura e que tiveram absorvância maior que 0,8 no segundo teste ELISA (em negrito na TABELA 2).

5.2.2 Seleção de soros positivos de cães com leishmaniose visceral

Após a pré-seleção de quarenta soros, a partir do resultado de um ELISA, do TR DPP® e do isolamento de cultura (TABELA 1), um segundo ELISA, utilizando antígeno total de *L. infantum*, foi realizado.

Os animais foram divididos em quatro grupos de dez cada. Desses quatro grupos, apenas dois deveriam conter resultados positivos, o que significa que o resultado final não poderia ultrapassar vinte soros. Apenas doze amostras apresentaram absorbância superior ao nível de corte (*Cut-off*), delimitado em 0,262, compatibilizando a sorologia dos cães para LV. Desta forma, decidiu-se selecionar os animais que tiveram resultados positivos nos três testes anteriores e absorbância acima de 0,7 no segundo ELISA (em negrito na TABELA 3), para que compusessem o *pool* que seria usado para o *screening* dos peptídeos.

TABELA 3 - ABSORBÂNCIAS DOS SOROS DE CÃES COM LV DO SEGUNDO TESTE ELISA

PACIENTES	ABSORBÂNCIA	PACIENTES	ABSORBÂNCIA
P1	0,786	P21	0,092
P2	0,555	P22	0,135
P3	0,409	P23	0,153
P4	0,847	P24	0,104
P5	0,721	P25	0,076
P6	0,744	P26	0,1
P7	0,798	P27	0,053
P8	0,878	P28	0,046
P9	0,796	P29	0,066
P10	0,451	P30	0,209
P11	0,122	P31	0,211
P12	0,116	P32	0,144
P13	0,104	P33	0,106
P14	0,189	P34	0,13
P15	0,147	P35	0,186
P16	0,183	P36	0,139
P17	0,096	P37	0,14
P18	0,492	P38	0,071
P19	0,18	P39	0,229
P20	0,579	P40	0,163

FONTE: O autor (2016).

5.3 PEPTÍDEOS SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* SEGUIDO DE ANÁLISE *IN SILICO*

Trinta e quatro peptídeos diferentes foram obtidos pela técnica *phage display* e sequenciados. Em seguida, os peptídeos foram submetidos à análise *in silico* (descrito no item 4.7). Dos trinta e quatro peptídeos, doze apresentaram escore acima de 0,8, sendo estes sintetizados e comparados às proteínas já depositadas em bancos (TABELA 4).

TABELA 4 - PROTEÍNAS RELACIONADAS ÀS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS POR *PHAGE DISPLAY*

Proteína relacionada ao peptídeo 1 – sequência SCQαGGCL
Telomerase reverse transcriptase [<i>L. amazonensis</i>]
Soluble promastigote surface antigen PSA-12S, partial [<i>L. amazonensis</i>]
mRNA cap methyltransferase-like protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Conserved hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Conserved hypothetical protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 2 – sequência ECLαGGCF
G3 (kinetoplast) [<i>L. amazonensis</i>]
Mitochondrial mitoferrin-like protein [<i>L. amazonensis</i>]
Conserved hypothetical protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 3 – sequência ECSαGGCS
Protein kinase-like protein [<i>L. mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]
Conserved hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Conserved hypothetical protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 4 – sequência αCQαGGCL
Soluble promastigote surface antigen PSA-38S [<i>L. amazonensis</i>]
Beta tubulin [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Conserved hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Conserved hypothetical protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 5 – sequência ECSαGGCSS
PDI, partial [<i>L. amazonensis</i>]
Conserved hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Putative nuclear pore complex protein (NUP155) [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 6 – sequência ECEFGGCM
Putative protein kinase [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Soluble promastigote surface antigen PSA-12S, partial [<i>L. amazonensis</i>]
Conserved hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Proteína relacionada ao peptídeo 7 – sequência KCRαGGCL
Telomerase reverse transcriptase [<i>L. amazonensis</i>]
Proteína relacionada ao peptídeo 8 – sequência ACαEVHPFDRCP
Conserved hypothetical protein [<i>L. mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]
Putative pre-mRNA splicing factor [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Protein kinase-like protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]

Proteína relacionada ao peptídeo 9 – sequência QCSPαSPGQC
Hypothetical predicted Kelch-domain protein [<i>L. mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]
Hypothetical predicted Kelch-domain protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]
Hypothetical predicted Kelch-domain protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 10 – sequência TCHPMDDPQSCα
NA polymerase II largest subunit, partial [<i>L. amazonensis</i>]
Proteína relacionada ao peptídeo 11 – sequência TCPKTHLPASCβ
PDI [<i>L. amazonensis</i>]
NADH dehydrogenase subunit 8 (kinetoplast) [<i>L. amazonensis</i>]
Conserved hypothetical protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
Proteína relacionada ao peptídeo 12 – sequência ACαEVHPFDRCP
Proline dehydrogenase [<i>L. amazonensis</i>]
Glucose-6-phosphate dehydrogenase [<i>L. amazonensis</i>]
Protein kinase-like protein [<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]
FONTE: O autor (2016).

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PELO TESTE ELISA

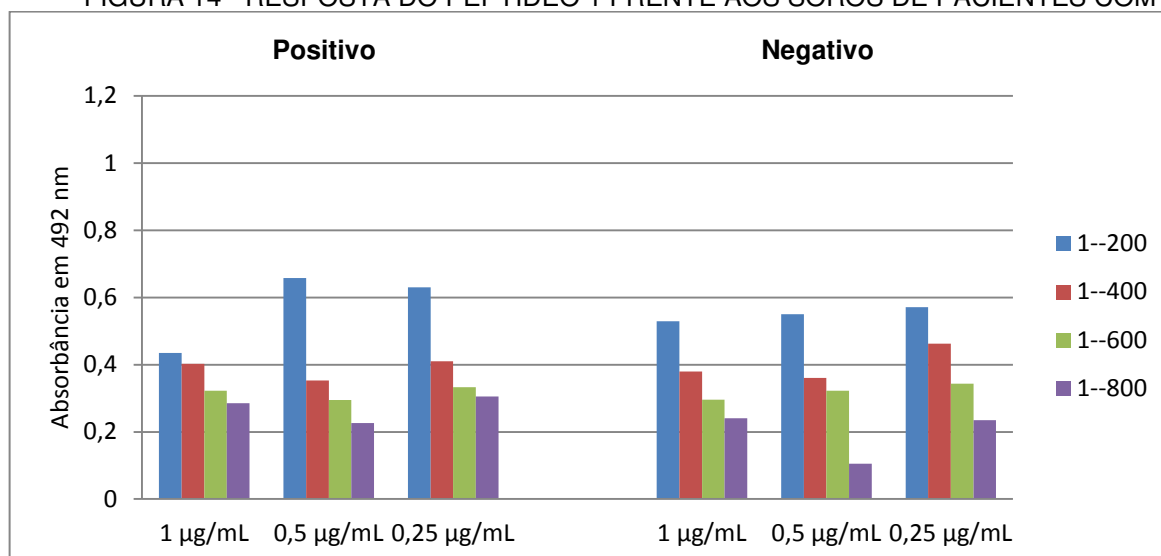
Os peptídeos obtidos pelo *phage display* foram avaliados com os soros de pacientes humanos e caninos usando o teste ELISA. Conforme a disposição mostrada na FIGURA 11, as placas foram montadas de forma que se tornasse possível avaliar o maior número de concentrações do antígeno e diluições dos soros. Os gráficos abaixo (itens 5.4.1 e 5.4.2) foram feitos utilizando o valor das absorbâncias dos soros positivos e negativos.

5.4.1 Peptídeos avaliados frente aos soros de humanos com leishmaniose cutânea

Nos testes consequentes, os peptídeos foram usados na substituição do antígeno total de *L. braziliensis*. Os soros dos pacientes manipulados nessa etapa compunham o *pool*, feito a partir dos resultados obtidos no item 5.2.1. Os resultados abaixo compõem peptídeos que tiveram diferenças de reatividade do soro positivo, em relação ao negativo, significativas e outras nem tanto, para que se pudesse comparar.

Na FIGURA 14 pode-se verificar que a avaliação do peptídeo 1 como antígeno exibe a maior diferença de reatividade do soro positivo em relação ao negativo quando usado na concentração de 0,5 µg/mL e diluição do soro 1:800.

FIGURA 14 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 1 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC

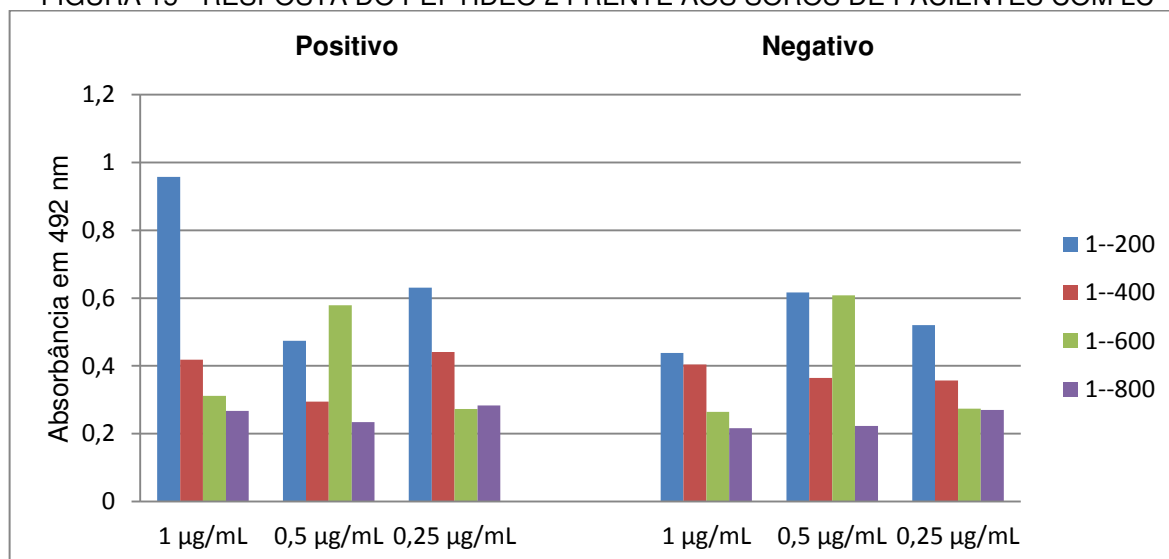


NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros humano positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Para o peptídeo 2, a maior diferença de reatividade do soro positivo em relação ao negativo, foi na concentração do antígeno 1 µg/mL e diluição do soro 1:200 (FIGURA 15).

FIGURA 15 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 2 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC



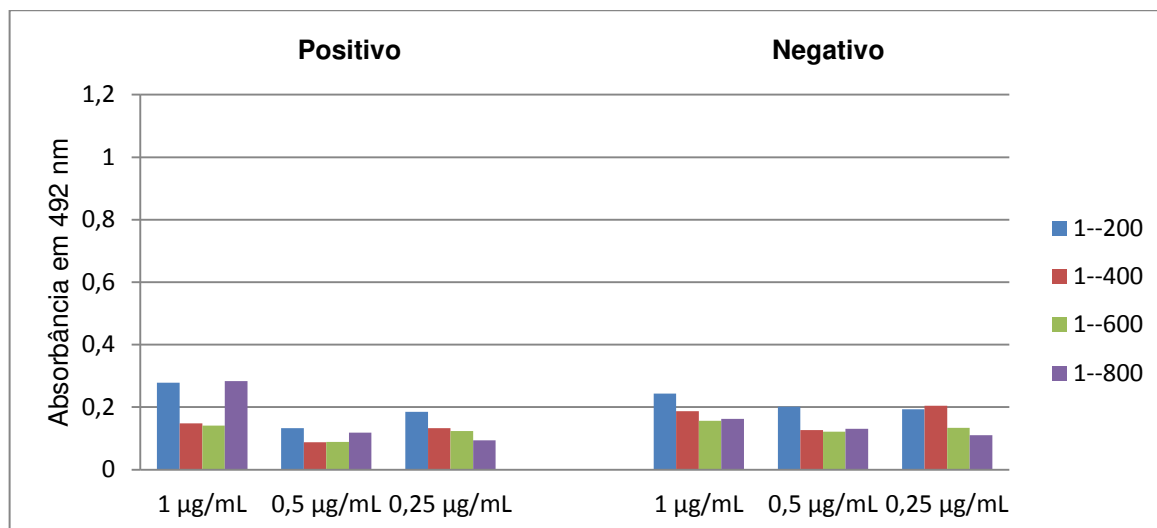
NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros humano positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Para o peptídeo 4, os resultados positivos e negativos se mantiveram bem próximos, porém, apesar de baixa, a maior diferença de reatividade do soro positivo

em relação ao negativo deu-se na concentração do antígeno 1 µg/mL e diluição do soro 1:800 (FIGURA 16). Resultados similares, no que se refere à baixa reatividade e incapacidade de distinção entre os soros positivos e negativos, foram obtidos também com os peptídeos 5, 8 e 12 (dados não mostrados).

FIGURA 16 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 4 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC

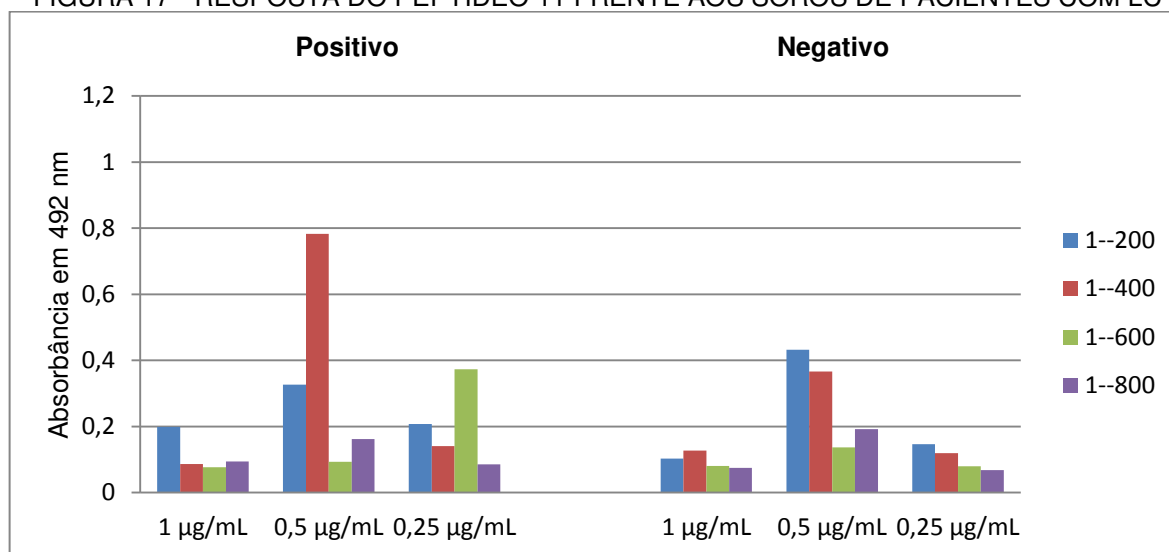


NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros humano positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

O peptídeo 11 exibiu significativa diferença de reatividade do soro positivo em relação ao negativo na concentração do antígeno 0,5 µg/mL e diluição do soro 1:400 (FIGURA 17).

FIGURA 17 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 11 FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC



NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros humano positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Para que fosse possível realizar análises em relação à eficiência dos peptídeos, na diferenciação dos soros positivos e negativos, a equação descrita no item 4.7 foi aplicada. A partir do valor obtido, observa-se que os peptídeos 1, 2 e 11 são os que apresentam os resultados mais próximos do valor máximo (1,0) (em negrito na TABELA 5), sendo o peptídeo 2 com maior destaque.

TABELA 5 - RESULTADO DO “ELISA SCORE” PARA OS PEPTÍDEOS TESTADOS FRENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM LC

PEPTÍDEO	ELISA SCORE
Peptídeo 1	0,535
Peptídeo 2	0,542
Peptídeo 3	0,133
Peptídeo 4	0,427
Peptídeo 5	0,3
Peptídeo 6	0,297
Peptídeo 7	0,056
Peptídeo 8	0,401
Peptídeo 9	0,394
Peptídeo 10	0,345
Peptídeo 11	0,531
Peptídeo 12	0,339

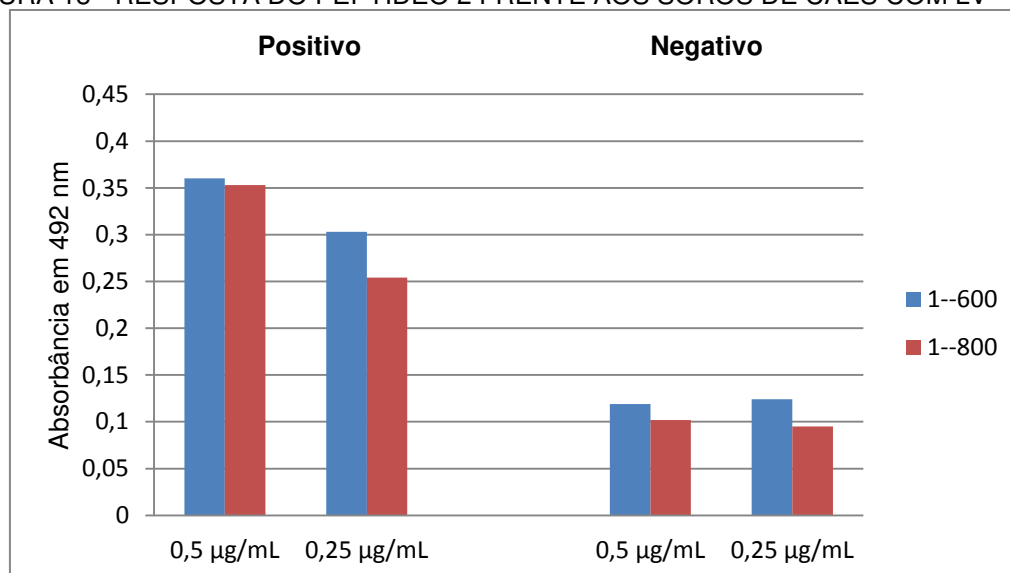
FONTE: O autor (2016).

5.4.2 Peptídeos avaliados frente aos soros de cães com leishmaniose visceral

Nos testes para verificação da atividade dos peptídeos, esses foram utilizados na substituição do antígeno total de *L. infantum*. Os soros manipulados nesta etapa compunham o *pool*, feito a partir dos resultados obtidos no item 5.2.2. Os gráficos abaixo são compostos dos peptídeos que tiveram diferenças de reatividade do soro positivo, em relação ao negativo, significativas e outras nem tanto, para que se pudesse comparar.

O peptídeo 2 exibe diferença de reatividade do soro positivo em relação ao negativo na concentração do antígeno 0,5 µg/mL e diluição do soro 1:800 (FIGURA 18).

FIGURA 18 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 2 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV

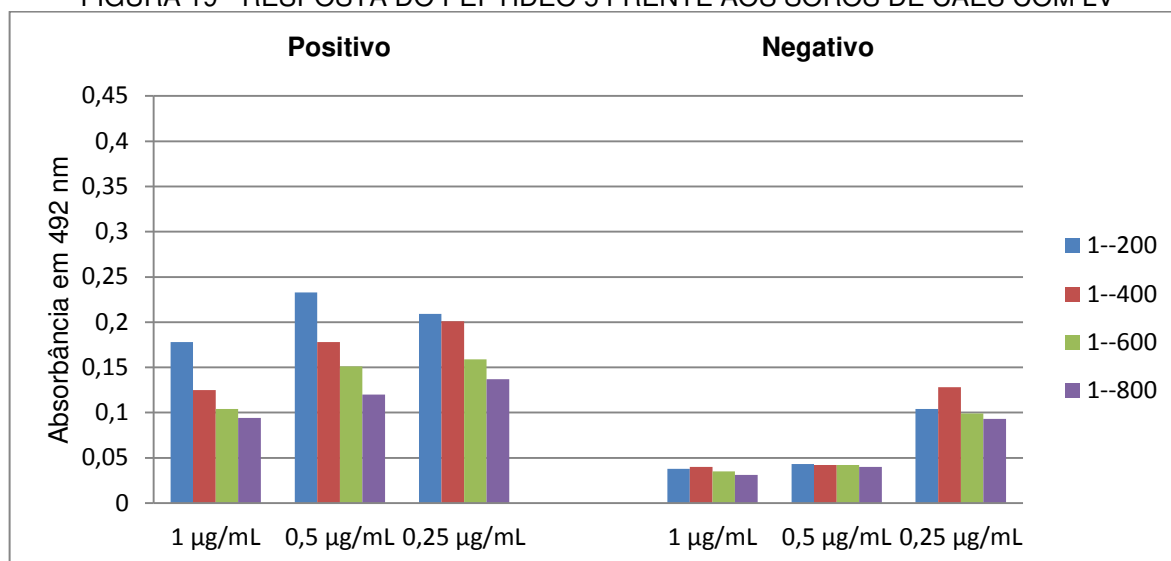


NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros canino positivo e negativo nas diluições 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG cão conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Para o peptídeo 5, a reatividade do soro positivo em relação ao negativo com maior diferença é da concentração do antígeno 0,5 µg/mL e diluição do soro 1:200 (FIGURA 19).

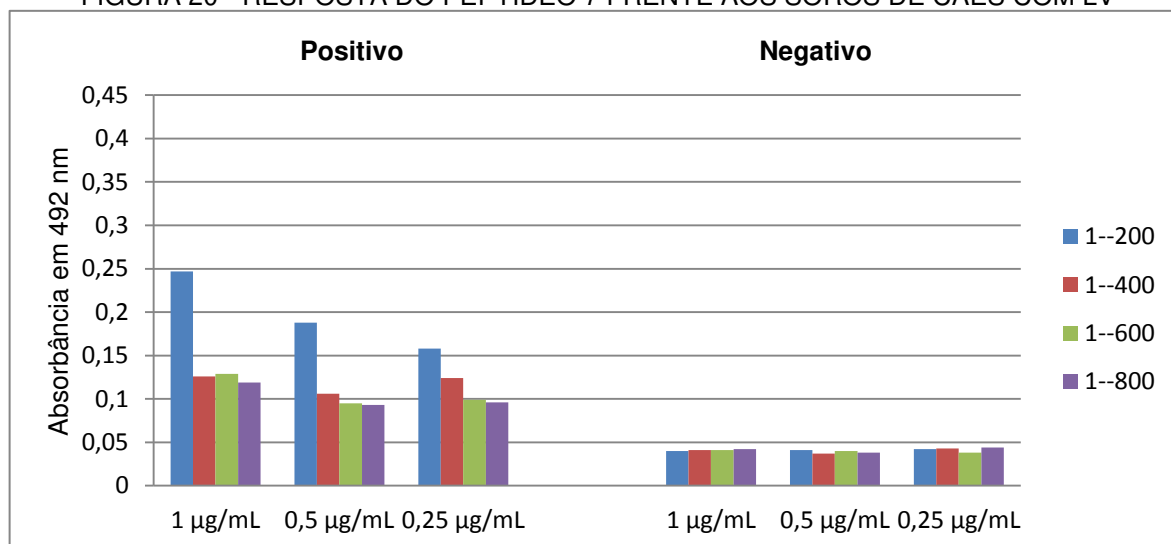
FIGURA 19 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 5 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV



NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros canino positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG cão conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.
 FONTE: O autor (2016).

O peptídeo 7 mostrou diferenciação de reatividade do soro positivo em relação ao negativo na diluição do soro 1:200 e concentração do antígeno 1 µg/mL (FIGURA 20).

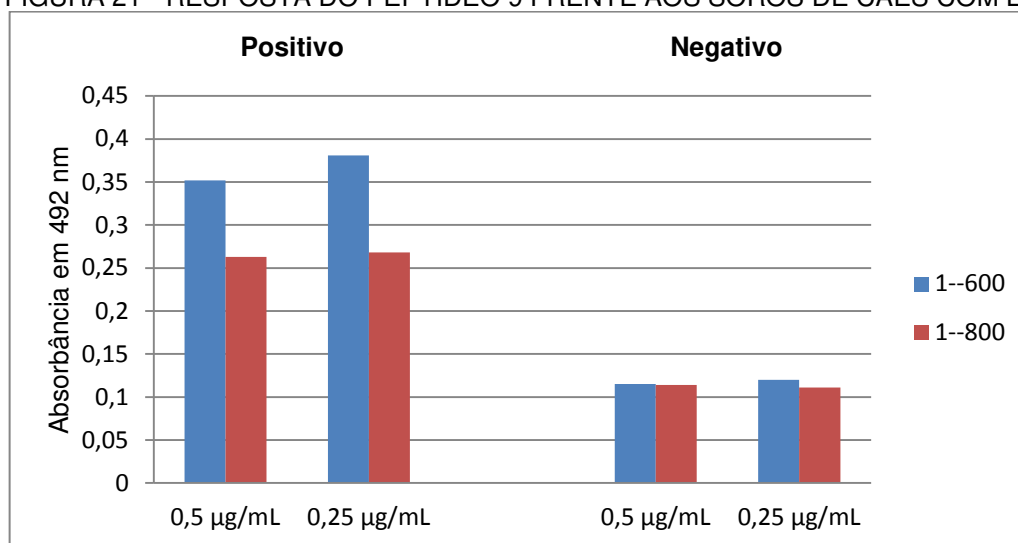
FIGURA 20 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 7 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV



NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros canino positivo e negativo nas diluições 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG cão conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.
 FONTE: O autor (2016).

O peptídeo 9 apresentou elevada diferença de reatividade do soro positivo em relação ao negativo na concentração do antígeno 0,25 µg/mL e diluição do soro 1:600 (FIGURA 21).

FIGURA 21 - RESPOSTA DO PEPTÍDEO 9 FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV



NOTA: Uma placa foi sensibilizada com 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL de peptídeo e incubada com *pool* de soros canino positivo e negativo nas diluições 1:600 e 1:800. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG cão conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

FONTE: O autor (2016).

Seguindo o mesmo critério, já exposto no item 5.4.1, e aplicando a equação, descrita no item 4.7, observou-se que os peptídeos 1, 5, 6, 7 e 10 são os que mais se aproximam do valor máximo (1,0) (em negrito na TABELA 6), sendo o peptídeo 7 aquele com maior destaque.

TABELA 6 - RESULTADO DO "ELISA SCORE" PARA OS PEPTÍDEOS TESTADOS FRENTE AOS SOROS DE CÃES COM LV

PEPTÍDEO	ELISA SCORE
Peptídeo 1	0,822
Peptídeo 2	0,711
Peptídeo 3	0,757
Peptídeo 4	0,745
Peptídeo 5	0,815
Peptídeo 6	0,818
Peptídeo 7	0,838
Peptídeo 8	0,788
Peptídeo 9	0,685
Peptídeo 10	0,8
Peptídeo 11	0,766
Peptídeo 12	0,61

FONTE: O autor (2016).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o uso da técnica *phage display* para a seleção de epítomos com potencial antigênico foi utilizada. Os peptídeos obtidos são miméticos de *L. amazonensis*. De trinta e quatro clones reagentes e sequenciados, doze foram selecionados por teste *in silico* e realizada a síntese química. Após a diluição dos mesmos, foram testados por reação antígeno-anticorpo, por ELISA, frente aos soros de pacientes humanos e caninos com diagnóstico confirmado para leishmanioses.

A identificação de epítomos e a utilização de peptídeos sintéticos vêm sendo uma alternativa utilizada frente aos antígenos totais. Esses podem servir de ferramenta para detecção de anticorpos específicos contra parasitos ou outros agentes patogênicos, bem como na formulação de vacinas. (NOGUEIRA, 2014; PAIVA, 2016).

A espécie de *Leishmania* usada na seleção de mimotopos foi a *L. amazonensis*, por ser de ampla utilização em diagnósticos no que se refere à LC e LV (MAYWALD *et al.*, 1996; BORGES *et al.*, 2002; ROMERO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005; ANTONIO, 2012), e ainda, por ser de cultivo menos laborioso que as demais.

Doze peptídeos sintéticos, mimotopos de *L. amazonensis*, foram avaliados pelo teste ELISA, primeiramente frente aos soros de humanos portadores de LC. Os resultados obtidos mostraram os diferentes comportamentos de cada peptídeo diante o *pool* de soros negativos e positivos, em diferentes concentrações e diluições.

Com base na análise feita, em relação à eficiência dos peptídeos na diferenciação dos soros positivos e negativos, por meio dos resultados apresentados nas FIGURAS 14 a 17, os peptídeos 2 e 11 tiveram o melhor desempenho.

Quando aplicada a equação “ELISA score”, os peptídeos 1, 2 e 11 ganharam destaque, tendo suas absorbâncias frente ao *pool* de soros positivo acima de 0,5. O peptídeo 2 apresentou melhor escore, embora o peptídeo 1 e 11 tenham valores semelhantes aos do peptídeo 2.

Os soros de cães infectados com *L. infantum* foram usados como teste para os doze peptídeos sintéticos, mimotopos de *L. amazonensis*. O teste foi realizado por ELISA, onde se puderam avaliar os diferentes comportamentos de cada

peptídeo diante o *pool* de soros negativos e positivos, em diferentes concentrações e diluições.

Segundo a análise feita, em relação à eficiência dos peptídeos na diferenciação dos soros positivos e negativos, baseada nos gráficos representados pelas FIGURAS 18 a 21, observou-se que os peptídeos 2 e 9 apresentaram melhor resultado.

Quando aplicada a equação “ELISA score”, os peptídeos 1, 5, 6, 7 e 10 foram os que apresentaram melhor desempenho na diferenciação dos soros positivos e negativos, tendo suas absorbâncias acima de 0,8.

Ao se comparar os resultados obtidos com os doze peptídeos frente aos soros de humanos e cães, o peptídeo 2 foi o que se mostrou eficaz tanto para LC como para LV. Contudo, essa comparação não pode ser realizada de uma forma simplista, uma vez que são soros contaminados por espécies de *Leishmania* diferentes. Consequentemente, há necessidade de se utilizar insumos específicos, como no caso o conjugado, embora ambos tenham sido produzidos em cabras.

No geral, os resultados com melhor desempenho dos peptídeos miméticos de *L. amazonensis* deram-se quando eles foram testados com soros de cães portadores de LV. Esse fato pode ser justificado pela próxima relação filogenética existente entre *L. infantum* e *L. amazonensis*, pois ambas pertencem ao mesmo subgênero *Leishmania*, enquanto que *L. braziliensis* pertence ao *Vianna*. (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993 a,b; REY, 2008). Esses resultados sugerem que peptídeos imunodominantes de *L. amazonensis* seriam bons alvos para o diagnóstico de leishmanioses causadas por espécies do subgênero *Leishmania*. Porém, menos eficientes no diagnóstico da LC causada por parasitos do subgênero *Viannia*, contrariando os estudos que utilizam a *L. amazonensis* para a substituição de antígenos de *L. braziliensis*. Corroborando com estes resultados nosso grupo já demonstrou que em área endêmica de *L. braziliensis* o uso de antígeno heterólogo de *L. amazonensis* reduz a sensibilidade do diagnóstico de LC, por teste ELISA, em 25%. (SZARGIKI *et al.*, 2009).

Nossos resultados sugerem que os peptídeos, miméticos de *L. amazonensis*, poderiam representar antígenos sintéticos valiosos para um imunodiagnóstico de LV ou LC causadas por espécies do subgênero *Leishmania*, abrindo a possibilidade de sua aplicação a outras abordagens diagnósticas também como fluxo lateral.

O *phage display* vem se destacando por se tratar de uma técnica que utiliza a expressão de peptídeos na superfície de fagos. Assim, é possível realizar a seleção de epítomos com potencial para fins diagnósticos e vacinais. É uma ferramenta biotecnológica que vem sendo empregada para melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes, bem como sua utilização como imunógenos. (ALBAN, 2011; SEGER, 2014; SOUZA *et al.*, 2014 a; PAIVA, 2016).

Trabalho realizado por Seger (2014), utilizou peptídeos miméticos para diagnóstico de LC. De quatrocentos e vinte oito clones obtidos, trinta e seis apresentaram reatividade frente aos soros de humanos com a doença e três peptídeos quimicamente sintetizados apresentaram sensibilidade e especificidade de 79% e 100%, respectivamente.

Costa *et al.* (2012), usaram combinações de cinco peptídeos derivados dos antígenos de *Leishmania* sp. no teste ELISA. Soros de humanos e cães com LV foram usados, obtendo uma sensibilidade e especificidade próximas a 100%. Além disso, observou-se alta sensibilidade e especificidade mesmo para soros caninos apresentando baixos títulos de anticorpos ou de animais assintomáticos. Os dados mostraram que a utilização de peptídeos sintéticos pode proporcionar uma alternativa para sensibilidades e especificidades melhoradas para ensaios de imunodiagnóstico de LV.

Pesquisa realizada por Costa *et al.* (2016), utilizaram o *phage display* para identificar ligantes com potenciais aplicações de diagnóstico. Seis clones foram selecionados, sequenciados e testados frente aos soros de humanos com LC e LV por ELISA. Três desses clones atingiram 100% de sensibilidade e especificidade, embora nenhuma menção tenha sido dada ao diagnóstico em cães.

Machado *et al.* (2015), utilizando a técnica *phage display*, selecionaram peptídeos por meio de IgGs purificadas do soro de cães com LV. Dos cento e noventa e oito clones obtidos, doze foram avaliados pelo teste ELISA. Desses doze, três se mostraram promissores para um futuro uso no imunodiagnóstico, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 76,81%.

Wang *et al.* (2010), descreveram uma vacina de peptídeo sintético à base de proteína da subunidade 2 de hemaglutinina (HA2), a qual proporciona proteção em ratos contra vírus de influenza dos subtipos estruturalmente divergentes H3N2, H1N1 e H5N1. Os dados do estudo demonstraram que a concepção específica do imunógeno é integral na indução de anticorpos anti-hemaglutinina ativos. Estes

resultados fornecem uma prova de conceito para uma vacina contra influenza baseada em HA2 que poderia diminuir a ameaça da doença pandêmica da gripe e, em geral, reduzir a importância dos vírus da gripe como patógenos humanos.

Handali *et al.* (2010), desenvolveram um Imunoensaio De Impressão Multiantigênica (MAPIA) para comparar o desempenho de múltiplas proteínas recombinantes de *Taenia solium* com o potencial para a detecção de cisticercose e teníase. Foram preparadas tiras MAPIA utilizando seis proteínas diagnósticas de cisticercose e duas de teníase, comparando o desempenho das proteínas com soros coletados de humanos com cisticercose definida e casos de teníase. Dos seis antígenos de cisticercose, um apresentou desempenho significativo, porém, nenhum dos antígenos poderia diferenciar as variadas apresentações clínicas de cisticercose. Ambos os antígenos de teníase apresentaram a mesma sensibilidade e especificidade dos testes já utilizados. Concluindo-se que MAPIA pode ser utilizada para comparar respostas de anticorpos a diferentes antígenos de cisticercose e teníase.

Camussone *et al.* (2009), avaliaram comparativamente cinco peptídeos recombinantes antigênicos de *Trypanosoma cruzi*. Três desses peptídeos foram selecionados para a construção de quimeras. Os peptídeos sortidos foram comparados, quanto à eficiência de discriminação, às quimeras por ELISA. Os dados do estudo sugerem que as quimeras apresentam melhores desempenhos no ELISA, produzindo uma sensibilidade adequada para diagnosticar a infecção por *Trypanosoma cruzi*, do que o uso dos mesmos peptídeos separadamente.

Martins *et al.* (2015), utilizaram uma versão recombinante da proteína rLiHyV como um marcador de diagnóstico para a LV canina. Inicialmente, a proteína rLiHyV foi avaliada por ELISA e reconhecida por anticorpos dos soros dos cães. Não se obteve reatividade cruzada com soros de cães vacinados nem com soros de animais infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Brucella canis* e *Ehrlichia canis*. Esse estudo mostrou pela primeira vez que a proteína LiHyV de *L. infantum* pode ser utilizada como um marcador de diagnóstico para LV.

Faria *et al.* (2015), testaram duas proteínas multiepítipo recombinantes (PQ10 e PQ20) para LV. Esses antígenos foram capazes de identificar os cães assintomáticos (80%) mais eficazmente do que o kit EIE-LVC Biomanguinhos (0%) e kit TR DPP® (10%). Além disso, essas proteínas apresentaram uma detecção precoce (antes da PCR) de cães infectados, com positividade variando de 23% a

65%. Os resultados apontam as proteínas PQ10 e PQ20 com grande potencial no diagnóstico precoce da LV em cães.

Diante do exposto, pode-se observar que, apesar do antígeno total ser eficiente na diferenciação dos soros positivos e negativos, há uma necessidade em desenvolver novos alvos antigênicos para o uso no sorodiagnóstico em humanos e cães, portadores de LC e LV, respectivamente.

A importância da padronização desses antígenos sintéticos faz-se necessária para que se possa assegurar a reprodutibilidade do teste diagnóstico. Uma alternativa de melhorar a reatividade e aumentar os resultados dos peptídeos testados seria a montagem de uma quimera, ou, outra possibilidade, o uso do conjugado biotina-estreptavidina no teste ELISA. Esse conjugado agiria como um amplificador de sinal, ou seja, potencializaria o teste, tornando os resultados positivos e negativos mais diferenciados.

7 CONCLUSÃO

A identificação de epítomos e a utilização de peptídeos sintéticos são uma alternativa a detecção de anticorpos específicos contra parasitos ou outros agentes patogênicos. Embora o uso dos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. infantum* foi satisfatório na distinção entre soros positivos e negativos, alternativas para sua substituição são necessárias, uma vez que os mesmos apresentam diversas desvantagens.

O teste ELISA permitiu a avaliação de doze peptídeos, obtidos por *phage display*, mimotopos de *L. amazonensis*, em relação à eficiência na diferenciação dos soros positivos e negativos, frente aos *pools* de soros de humanos com LC e cães com LV.

Ao se comparar os resultados obtidos com os peptídeos, pode-se observar o significativo desempenho positivo destes para com o soro de cães portadores de LV, fato que pode ser justificado pela próxima relação filogenética existente entre *L. infantum* e *L. amazonensis*, pois ambas pertencem ao mesmo subgênero *Leishmania*.

Esses resultados sugerem que peptídeos imunodominantes de *L. amazonensis* seriam bons alvos para o diagnóstico de leishmanioses causadas por espécies do subgênero *Leishmania*.

Alternativas para melhorar a reatividade e aumentar os resultados dos peptídeos testados seriam: a montagem de uma quimera ou o uso do conjugado biotina-estreptavidina no teste ELISA, como um amplificador de sinal, potencializando as diferenciações entre soros positivos e negativos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; AZEVEDO, A. C. R.; MEDEIROS, W. M.; ALVES, J. R. C.; RENDEIRO, V. Aspects Of The Ecology Of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In An Área Of Cutaneous Leishmaniasis Occurrence, Municipality Of Angra Dos Reis, Coast Of Rio De Janeiro State, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical**, V.56, N.2, P.143-149, 2014.
- ALBAN, S. M. **Uso De Peptídeos Para O Diagnóstico Imunológico Da Hanseníase**. Tese (Doutorado Em Processos Biotecnológicos) – Setor De Tecnologia, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2011.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide And Global Estimates Of Its Incidence. **Plos One**, V.7, 2012.
- ANTONIO, L. F. **Resposta À Intradermorreação De Montenegro, Tempo De Evolução Da Lesão E Ocorrência De Falha Terapêutica Na Forma Cutânea Da Leishmaniose Tegumentar Americana: Um Estudo Caso-Control**. Dissertação (Mestrado Em Pesquisa Clínica Em Doenças Infecciosas) – Setor De Ciências Da Saúde, Instituto De Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio De Janeiro, 2012.
- ARAÚJO, A. R. **Fatores De Risco Associados À Leishmaniose Tegumentar Americana Em Área Endêmica Do Estado De Pernambuco, Brasil**. Dissertação (Mestrado Em Medicina Tropical) – Setor De Ciências Da Saúde, Universidade Federal De Pernambuco, Recife, 2014.
- ASSIS, E. A. **Influência Da Manutenção De *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Em Meio De Cultura Axênico Sobre A Infecciosidade Dos Parasitos E Sua Correlação Com A Atividade Ecto-Nucleotidástica**. Dissertação (Mestrado Em Ciências Biológicas) – Setor De Ciências Biológicas, Universidade Federal De Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.
- BATISTA, F. M. A.; MACHADO, F. F. O. A.; SILVA, J. M. O.; MITTMANN, J.; BARJA, P. R.; SIMIONI, A. R. Leishmaniose: Perfil Epidemiológico Dos Casos Notificados No Estado Do Piauí Entre 2007 E 2011. **Revista Univap**, V.20, N.35, P.44-55, 2013.
- BORGES, V. C.; RUIZ, M. C. M.; GOMES, P. M.; COLOMBO, A. R.; SILVA, L. M.; ROMERO, H. D.; PRATA, A. Intradermorreação De Montenegro Após Sucessivas Repetições Do Teste Em Porteirainha, MG. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.36, N.2, P.249-251, 2002.
- BOTTINO, C. G.; GOMES, L. P.; PEREIRA, J. B.; COURA, J. R.; JUNIOR, D. W. P.; SIMONE, S. G. Chagas Disease-Specific Antigens: Characterization Of Epitopes In Cra/Fra By Synthetic Peptide Mapping And Evaluation By Elisa-Peptide Assay. **Bmc Infectious Diseases**, V.13, 2013.

BRAZIL, R. P.; PONTES, M. C. Q.; PASSOS, W. L.; FUZARI, A. A.; BRAZIL, B. G. *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In The Region Of Saquarema: Potential Área Of Visceral Leishmaniasis Transmission In The State Of Rio De Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.45, N.1, P.120-121, 2012.

CALDAS, A. J. M.; LISBÔA, L. L. C.; SILVA, P. F.; COUTINHO, N. P. S.; SILVA, T. C. Perfil Das Crianças Com Leishmaniose Visceral Que Evoluíram Para Óbito, Falha Terapêutica E Recidiva Em Hospital De São Luís, Maranhão. **Revista De Pesquisa Em Saúde**, V.14, N.2, P.91-95, 2013.

CAMUSSONE, C.; GONZALEZ, V.; BELLUZO, M. S.; PUJATO, N.; RIBONE, M. E.; LAGIER, C. M.; MARCIPAR, I. S. Comparison Of Recombinant *Trypanosoma Cruzi* Peptide Mixtures Versus Multiepitope Chimeric Proteins As Sensitizing Antigens For Immunodiagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.16, N.6, P.899-905, 2009.

CASTRO, E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; THOMAZ-SOCCOL, V. Eco-Epidemiological Survey Of *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* American Cutaneous And Mucocutaneous Leishmaniasis In Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, V.93, P.141-149, 2005.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo Das Características Epidemiológicas E Clínicas De 332 Casos De Leishmaniose Tegumentar Notificados Na Região Norte Do Estado Do Paraná De 1993 A 1998. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.35, N.5, P.445-452, 2002.

COSTA, L. E.; LIMA, M. I. S.; FUMAGALLI, M. A. C.; SOUZA, D. M.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; LAGE, P.S.; LOPES, E. G. P.; LAGE, D. P.; RIBEIRO, T. G.; ANDRADE, P. H. R.; SOARES, D. F. M.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. F. Subtractive Phage Display Selection From Canine Visceral Leishmaniasis Identifies Novel Epitopes That Mimic *Leishmania Infantum* Antigens With Potential Serodiagnosis Applications. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.21, N.1, P.96-106, 2014.

COSTA, L. E.; SALLES, B. C. S.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C. S.; VAZ, E. R.; RAMOS, F. F.; SOUZA, D. M.; DUARTE, M. C.; ROATT, B. M.; FUMAGALLI, M. A. C.; TAVARES, C. A. P.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, M. O. C.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. F. New Serological Tools For Improved Diagnosis Of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Journal Of Immunological Methods**, V.434, P.39-45, 2016.

COSTA, M. M.; PENIDO, M.; SANTOS, M. S.; DORO, D.; FREITAS, E.; MICHALICK, M. S. M.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Improved Canine And Human Visceral Leishmaniasis Immunodiagnosis Using Combinations Of Synthetic Peptides In Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Plos One**, V.6, 2012.

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; MORALES, C. Z.; CARTER, L.; MOHAMATH, R.; ITO, L.; OYAFUSO, L. K. M.; MANINI, M. I. P.; BALAGON, M. V.; TAN, E. V.; SAUNDERSON, P. R.; REED, S. G.; CARTER, D. Rational Design And Evaluation Of A Multiepitope Chimeric Fusion Protein With The Potential For Leprosy Diagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.17, N.2, P.298-303, 2010.

FARIA, A. R.; COSTA, M. M.; GIUSTA, M. S.; JUNIOR, G. G.; PENIDO, M. L. O.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. High-Throughput Analysis Of Synthetic Peptides For The Immunodiagnosis Of Canine Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, V.5, 2011.

FARIA, A. R.; VELOSO, L. C.; VITAL, W. C.; REIS, A. B.; DAMASCENO, L. M.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. Novel Recombinant Multiepitope Proteins For The Diagnosis Of Asymptomatic *Leishmania Infantum* - Infected Dogs. **Plos One**, V.9, 2015.

FERREIRA, J. V. S.; SANTOS, T. V.; SANTOS, E. M.; GORAYEB, I. S. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) In Forest Fragments Of Belém Metropolitan Area, Pará State, Brazil, With Considerations On Vectors Of American Cutaneous Leishmaniasis Agentes. **Revista Pan-Amazônica De Saúde**, V.5, N.2, P.29-35, 2014.

FREITAS, L. C. S.; FEITOSA, A. C. Espaço E Saúde: Condições Socioambientais Favoráveis À Leishmaniose Visceral (LV) Na Bacia Do Rio Anajá Em Paço Do Lumiar – MA. **Revista Brasileira De Geografia Médica E Da Saúde**, V.10, N.18, P.33-45, 2014.

GELUK, A.; SPENCER, J.; BOBOSHA, K.; PESSOLANI, M. C. V.; PEREIRA, G. M. B.; BANU, S.; HONORE, N.; REECE, S. T.; DONALD, M. M.; SAPKOTA, B. R.; RANJIT, C.; FRANKEN, K. L. M. C.; ZEWDIE, M.; ASEFFA, A.; HUSSAIN, R.; STEFANI, M. M.; CHO, S. N.; OSKAM, L.; BRENNAN, P. J.; DOCKRELL, H. M. From Genome-Based In Silico Predictions To Ex Vivo Verification Of Leprosy Diagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.16, N.3, P.352-359, 2009.

HANDALI, S.; KLARMAN, M.; GASPARD, A. N.; NOH, J.; LEE, Y. M.; RODRIGUEZ, S.; GONZALEZ, A. E.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. W.; WILKINS, P. P. Multiantigen Print Immunoassay For Comparison Of Diagnostic Antigens For *Taenia Solium* Cysticercosis And Taeniasis. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.17, N.1, P.68-72, 2010.

HIRSCHMANN, L. C.; BROD, C. S.; RADIN, J.; SIMON, C. F.; RECUERO, A. L. C. Leishmaniose Visceral Canina: Comparação De Métodos Sorológicos Em Cães De Área Indene Do Rio Grande Do Sul No Brasil. **Revista De Patologia Tropical**, V.44, N.1, P.33-44, 2015.

IGARASHI, M.; SANTOS, V. J. T.; MINOZZO, E. S.; LEMOS, R. S.; MURARO, L. S.; GOMES, A. H. B.; YAMANAKA, A. R. Avaliação Do Nível De Conhecimento Dos Médicos Veterinários Dos Municípios De Cuiabá E Várzea Grande - Estado De Mato Grosso Sobre Leishmaniose Visceral. **Revista Veterinária E Zootecnia**, V.21, N.4, P.595-603, 2014.

JOSÉ, F. F.; SILVA, I. M.; ARAÚJO, M. I.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Avaliação Do Poder Sensibilizante Da Reação De Montenegro. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.34, N.6, P.537-542, 2001.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, V.7, P.1204-1214, 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The Leishmaniasis In Biology And Medicine**, 1987.

LANA, R. S. **Eco-Epidemiologia Das Leishmanioses Em Jaboticatubas, Serra Do Cipó, Um Importante Pólo Turístico De Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado Em Ciências Da Saúde) - Centro De Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

LISBOA, J. L. C.; COSTA, G. S.; RAMOS, E. M. L. S.; ARAÚJO, A. R.; SOUZA, V. M. P. Determinantes Letais Contribuintes Para Óbitos Por Leishmaniose Visceral. **Revista Da Estatística**, V.3, N.3, P.358-363, 2014.

LOPES, J. V. **Epidemiologia Da Leishmaniose Visceral No Município De Sabará, Região Metropolitana De Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado Em Ciências Da Saúde) - Centro De Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. **The Journal Of Biological Chemistry**, V.193, P.265-275, 1951.

MACHADO, C. M. T.; AVILA, R. A. M.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; BUENO, L. L.; CARNEIRO, C. M.; SOUZA, D. M.; CARNEIRO, R. A.; OLÓRTEGUI, C. C.; FUJIWARA, R. T. Immunodiagnosis Of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected From Phage Displayed Combinatorial Libraries. **Biomed Research International**, 2015.

MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; FUMAGALLI, M. A. C.; SOUZA, D. M.; COELHO, C. S. P.; SOARES, D. F. M.; FERNANDES, A. P.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. A Leishmania-Specific Hypothetical Protein Expressed In Both Promastigote And Amastigote Stages Of *Leishmania Infantum* Employed For The Serodiagnosis Of, And As A Vaccine Candidate Against, Visceral Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, V.8, 2015.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; CRUZ, J. M. C.; PIRES, M. R. F. G. Leishmaniose Tegumentar, Visceral E Doença De Chagas Caninas Em Municípios Do Triângulo Mineiro E Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos De Saúde Pública**, V.12, N.3, P.321-328, 1996.

MENDES, T. A. O.; CUNHA, J. L. R.; LOURDES, R. A.; LUIZ, G. F. R.; LEMOS, L. D.; SANTOS, A. R. R.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; FUJIWARA, R. T.; GAZZINELLI, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Identification Of Strain-Specific B-Cell Epitopes In *Trypanosoma Cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction And High-Throughput Immunoscreening With Peptide Arrays. **Plos One**, V.7, 2013.

MENEZES, J. A. **Leishmanioses: Estudos Epidemiológicos E O Conhecimento Da População De Formiga, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado Em Ciências Da Saúde) - Centro De Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

MERRIFIELD, R. B. **Advances In Enzymology And Related Areas Of Molecular Biology**, V.32, 1969.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Secretaria De Vigilância Em Saúde**, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância E Controle Da Leishmaniose Visceral. **Secretaria De Vigilância Em Saúde**, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Disponível Em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/component/search/?searchword=leishmaniose%20viscera&searchphrase=all&itemid=242>. Acesso Em: 30/10/2016.

MONTEIRO, A. G. **Diagnóstico Molecular E Identificação Das Espécies De Leishmania Na Leishmaniose Visceral Canina No Distrito Federal, Brasil**. Dissertação (Mestrado Em Biologia Microbiana) – Setor De Biologia Celular, Universidade De Brasília, Brasília, 2014.

MORAES, J. L. P.; SANTOS, C. L. C.; BASTOS, V. J. C.; PEREIRA, A. C. N.; MORAES, L. S.; MORAES, J. R. L.; COSTA, M. C.; REBÊLO, J. M. M. Espécies De Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) Em Matas Ciliares Na Transição Entre A Amazônia Úmida E O Nordeste Semi-Árido Do Brasil. **Entomotropica**, V.30, N.3, P.20-29, 2015.

MOSCHIN, J. C.; OVALLOS, F. G.; SEI, I. A.; GALATI, E. A. B. Ecological Aspects Of Phlebotomine Fauna (Diptera, Psychodidae) Of Serra Da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan Region, State Of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira De Epidemiologia**, V.16, N.1, P.190-201, 2013.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações Sobre A Leishmaniose Tegumentar Americana E Sua Expansão No Território Brasileiro. **Revista Percorso**, V.6, N.1, P.147-168, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios De Bioquímica**, 2006.

NOGUEIRA, C. T. **Busca De Antígenos Para Diagnóstico Da Leishmaniose Visceral Canina: Potencial Uso E Aplicação Da Proteína Rlc36.** Tese (Doutorado Em Biotecnologia) – Setor De Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; BÔAS, G. K. V. Oportunidades Para Inovação No Tratamento Da Leishmaniose Usando O Potencial Das Plantas E Produtos Naturais Como Fontes De Novos Fármacos. **Revista Fitos**, V.8, N.1, 2013.

PAIVA, V. F. **Utilização De Peptídeos Sintéticos Derivados De Moléculas Imunodominantes De *Toxoplasma Gondii* Para Diagnóstico Sorológico Da Toxoplasmose Em Ovinos E Galinhas Caipiras.** Dissertação (Mestrado Em Imunologia E Parasitologia Aplicadas) – Setor De Ciências Biomédicas, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2016.

PEIXOTO, J. C. **Tecnologia De *Phage Display* Para Obtenção De Antígenos Sintéticos E Utilização No Diagnóstico E Imunoproteção Da Cisticercose.** Dissertação (Mestrado Em Microbiologia, Parasitologia E Patologia) - Setor De Patologia Básica, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2011.

PEREIRA, A. A. S. **Avaliação Da Infecção Por *Leishmania* Spp. Em Pequenos Mamíferos De Áreas Endêmicas De Minas Gerais, Brasil.** Dissertação (Mestrado Em Ciências Da Saúde) - Centro De Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global Distribution Maps Of The Leishmanias. **Elife**, V.3, 2014.

POSSAS, J. L. S. **Pré-Validação Do Ensaio Imunoenzimático Para Quantificação Do Teor De Ovoalbumina Na Vacina Contra Febre Amarela.** Especialização Em Controle Da Qualidade De Produtos, Ambientes E Serviços Vinculados À Vigilância Sanitária – Setor De Controle De Qualidade Em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro, 2012.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos Do Brasil**, 2003.

REIS, R.; MORI, F. M. R. L.; REIS, C. R.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; CHRYSSAFIDIS, A. L.; TEDIM, A. V.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L. B.; NAVARRO, I. T. Soroprevalência Da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) Canina E Fauna De Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Em Bela Vista Do Paraíso, Paraná. **Revista Brasileira De Medicina Veterinária**, V.32, N.3, P.1083-1094, 2011.

REY, L. **Parasitologia**, 2008.

ROMERO, H. D.; PRATA, A.; VERGARA, M. L. S.; SILVA, L. A. Comparação De Dois Antígenos Para Intradermoreação De Montenegro. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.37, N.6, P.508-509, 2004.

ROSS, R. Further Notes On *Leishman's* Bodies. **The British Medical Journal**, P.1401, 1903.

SANTARÉM, N.; SILVESTRE, R.; CARDOSO, L.; SCHALLING, H.; REED, S. G.; SILVA, A. C. C. Application Of An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method For Serological Diagnosis Of Canine Leishmaniasis. **Journal Of Clinical Microbiology**, V.48, N.5, P.1866-1874, 2010.

SANTOS, E. M. **Seleção De Peptídeos Miméticos Aos Antígenos Imunogênicos Do Vírus Da Anemia Infecciosa Equina E Do Vírus Da Leucose Bovina, A Partir De Bibliotecas De Phage Display**. Tese (Doutorado Em Ciência Animal) - Escola De Veterinária, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SANTOS, J. L. C.; MELO, M. B.; FERREIRA, R. A.; FONSECA, A. F. Q.; VARGAS, M. L. F.; GONTIJO, C. M. F. Leishmaniose Tegumentar Americana Entre Os Indígenas Xakriabá: Imagens, Ideias, Concepções E Estratégias De Prevenção E Controle. **Revista Saúde E Sociedade**, V.23, N.3, P.1033-1048, 2014.

SEGER, J. **Peptídeos Sintéticos Para Diagnóstico E Imunoprofilaxia Da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Tese (Doutorado Em Microbiologia, Parasitologia E Patologia) - Setor De Patologia Básica, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, M. B. R. **Desenvolvimento De Biossensor Para O Diagnóstico Sorológico Da Hanseníase**. Dissertação (Mestrado Em Engenharia De Processos Biotecnológicos) - Setor De Tecnologia, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2013.

SIRIMA, S. B.; TIONO, A. B.; OUÉDRAOGO, A. D.; DIARRA, A.; OUÉDRAOGO, A. L. D.; YARO, J. B.; OUÉDRAOGO, E. D.; GANSENÉ, A.; BOUGOUMA, E. C.; KONATÉ, A. T.; KABORÉ, Y.; TRAORÉ, A.; ROMA, C.; SOULAMA, I.; LUTY, A. J. F.; COUSEN, S.; NÉBIÉ, I. Safety And Immunogenicity Of The Malaria Vaccine Candidate Msp3 Long Synthetic Peptide In 12–24 Months-Old Burkinabe Children. **Plos One**, V.4, 2009.

SOUZA, A. P.; SOTO, M.; COSTA, J. M. L.; BOAVENTURA, V. S.; OLIVEIRA, C. I.; CRISTAL, J. R.; NETTO, M. B.; BARRAL, A. Towards A More Precise Serological Diagnosis Of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. **Plos One**, V.8, 2013.

SOUZA, D. M.; MENDES, T. A. O.; GOMES, M. S.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T. Improving Serodiagnosis Of Human And Canine Leishmaniasis With Recombinant *Leishmania Braziliensis* Cathepsin L-Like Protein And A Synthetic Peptide Containing Its Linear B-Cell Epitope. **Plos One**, V.9, 2015.

SOUZA, D. M.; MENDES, T. A. O.; GOMES, M. S.; CUNHA, J. L. R.; NAGEM, R. A. P.; CARNEIRO, C. M.; COELHO, A. A. F.; GALVÃO, L. M. C.; FUJIWRARA, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Epitope Mapping Of The Hsp83.1 Protein Of *Leishmania Braziliensis* Discloses Novel Targets For Immunodiagnosis Of Tegumentary And Visceral Clinical Forms Of Leishmaniasis. **Clinical And Vaccine Immunology**, V.21, N.7, P.949-959, 2014, A.

SOUZA, D. M.; MENDES, T. A. O.; NAGEM, R. A. P.; SANTOS, T. T. O.; SILVA, A. L. T.; SANTORO, M. M.; CARVALHO, S. F. G.; COELHO, E. A. F.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T. Mapping B-Cell Epitopes For The Peroxidoxin Of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* And Its Potential For The Clinical Diagnosis Of Tegumentary And Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, V.9, 2014, B.

SOUZA, M. A.; SILVA, A. G.; CARDOSO, S. R. A.; JUNIOR, S. F.; FERREIRA, M. S. Perfil De Isotipos De Imunoglobulinas E Subclasses De IgG Na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, V.38, N.2, P.137-141, 2005.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison Of Serological And Parasitological Methods For Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis In The State Of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, V.13, N.1, P.47-52, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.; ALBAN, S. M.; SEGER, J. Peptídeos Miméticos De *Leishmania* Sp. Processo Para Sua Obtenção E Aplicações. Brazilian Patent 10200150177240, 2015.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos Alóctones De Leishmaniose Visceral Canina No Paraná, Brasil: Implicações Epidemiológicas. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, V.18, N.3, P.46-51, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; DUMAS, A. M.; SERRES, E. Phylogenetic Taxonomy Of New World *Leishmania*. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee**, V.68, N.2, P.104-106, 1993, A.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; DUMAS, A. M.; SERRES, E. Monophyletic Origin Of The Genus *Leishmania* Ross, 1903. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee**, V.68, N.2, P.107-108, 1993, B.

WANG, T. T.; TAN, G. S.; HAI, R.; PICA, N.; NGAI, L.; EKIERT, D. C.; WILSON, I. A.; SASTRE, A. G.; MORAN, T. M.; PALESE, P. Vaccination With A Synthetic Peptide From The Influenza Virus Hemagglutinin Provides Protection Against Distinct Viral Subtypes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, V.107, N.44, 2010.

WHELAN, A. O.; CLIFFORD, D.; UPADHYAY, B.; BREADON, E.; NAIR, J. M.; HEWINSON, G. R.; VORDERMEIER. Development Of A Skin Test For Bovine Tuberculosis For Differentiating Infected From Vaccinated Animals. **Journal Of Clinical Microbiology**, V.48, N.9, P.3176-3181, 2010.

WHO, 2014. Disponível Em:

http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/index.html. Acesso Em: 30/08/2015 E 15/11/2016.